

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



**Jana Nedvěďová**

Vliv iontu  $\text{Ca}^{2+}$  na aktivitu lidské glutamátcarboxypeptidasy II.

The effect of  $\text{Ca}^{2+}$  ion on the enzymatic activity of human glutamate carboxypeptidase II

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Cyril Bařinka, Ph.D.

Praha, 2017

**Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 22. května 2017

---

## **Abstrakt**

Lidská glutamátcarboxypeptidasa II (GCPII, EC 3.4.17.24) je homodimerní membránový glykoprotein, který slouží jako marker rakoviny prostaty a rovněž jako terapeutický cíl léčby neurodegenerativních onemocnění. Extracelulární část GCPII je složená z apikální, proteasové a C-koncové domény. V aktivním místě jsou přítomny dva zinečnaté ionty nezbytné pro enzymatickou aktivitu. V blízkosti dimerizačního rozhraní je pak mezi apikální a proteasovou doménou koordinován ion  $\text{Ca}^{2+}$ , který je od aktivního místa vzdálen 20 Å, a tudíž se pravděpodobně přímo neúčastní hydrolýzy substrátů. Předkládaná práce si klade za cíl objasnit funkci iontu  $\text{Ca}^{2+}$  v molekule GCPII s využitím kombinace molekulárně-biologických, biochemických a biofyzikálních přístupů. Za tímto účelem jsme připravili sérii rekombinantních proteinů s bodovými mutacemi aminokyselin koordinujících  $\text{Ca}^{2+}$  ion. Mutantní proteiny byly exprimovány v hmyzích S2 buňkách a purifikovány pomocí afinitní a gelové permeační chromatografie. Tyto proteiny vykazovaly výrazně sníženou enzymatickou aktivitu, nižší teplotní stabilitu a zvýšenou tendenci k tvorbě nefyziologických agregátů a naopak monomerní formy GCPII. Z výsledků tedy vyplývá, že ion  $\text{Ca}^{2+}$  hraje zásadní roli pro správné sbalování GCPII a rovněž pro tvorbu homodimerů, které jsou fyziologickou a hydrolyticky aktivní formou tohoto enzymu.

**Klíčová slova:** glutamátcarboxypeptidasa II, metaloprotein,  $\text{Ca}^{2+}$  ion, koordinace iontů

## **Abstract**

Human glutamate carboxypeptidase II (GCPII, EC 3.4.17.24) is a homodimeric membrane glycoprotein. GCPII has been studied as a marker of prostate carcinoma and a therapeutic target of neurodegenerative disorders. The extracellular region of the protein is composed of three domains, apical, protease and C-terminal. There are two zinc ions in the active site that are essential for the enzymatic activity. A calcium ion is located between apical and protease domains near the dimeric interface approximately 20 Å away from the active site. Consequently, the  $\text{Ca}^{2+}$  ion is unlikely to participate in substrate hydrolysis. The aim of this thesis is to elucidate the function of  $\text{Ca}^{2+}$  in GCPII using a combination of molecular-biological, biochemical and biophysical approaches. To this end we prepared series of GCPII variants with mutations in calcium-coordinating amino acids. The mutant constructs were expressed in insect S2 cells and purified by combination of affinity and size exclusion chromatography. Enzymatic activity and thermostability of the mutants were decreased significantly. Furthermore, mutated proteins were aggregation prone and formed a monomeric GCPII species. Our results thus show that  $\text{Ca}^{2+}$  ion plays an essential role in proper GCPII folding as well as the formation of a homodimer molecule that is physiological and enzymatically active form of the enzyme.

**Key words:** glutamate carboxypeptidase II, metalloprotein,  $\text{Ca}^{2+}$  ion, ion coordination

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Cyrilovi Bařinkovi, Ph.D. za poskytnutí odborných konzultací, za veškeré připomínky a čas, který mi věnoval. Dále upřímně děkuji Mgr. Jakubovi Ptáčkovi za rady a pomoc při experimentální práci a interpretaci výsledků, ochotu a poskytnutí cenných rad. Dále také děkuji všem zaměstnancům Laboratoře strukturní biologie AV ČR, jmenovitě Báře Havlínové, Petře Baranové, Zorce Novákové, Žofce Kutil, Kseniyi Ustinové, Janě Mikešové, Shivamovi Shukla a Ivě Jelínkové za vytvoření příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě děkuji svým blízkým za veškerou podporu po celou dobu studia.

# Obsah

1	Úvod .....	3
2	Teoretická část .....	4
2.1	Výskyt GCPII .....	4
2.1.1	Fyziologický výskyt GCPII .....	4
2.1.2	Patofyziologický výskyt GCPII .....	6
2.2	Diagnostické a terapeutické využití GCPII .....	6
2.2.1	Inhibice GCPII v nervové tkáni .....	6
2.2.2	GCPII jako PSMA .....	7
2.3	Ionty kovů v proteinech .....	8
2.3.1	Funkce iontů kovů v proteinech .....	8
2.3.2	Koordinace iontů kovů v molekulách proteinů .....	8
2.4	Struktura GCPII .....	12
2.4.1	Vazebné místo $\text{Ca}^{2+}$ iontu v GCPII .....	13
3	Experimentální část .....	15
3.1	Použitý materiál .....	15
3.2	Použité přístroje .....	17
3.3	Použité metody .....	18
4	Výsledky .....	27
4.1	Streptaktinová afinitní chromatografie .....	28
4.1.1	Preparativní gelová permeační chromatografie .....	29
4.2	Radiometrické měření aktivity .....	31
4.3	Nanodiferenční skenovací fluorimetrie .....	32
4.3.1	Analytická gelová permeační chromatografie .....	34
4.3.2	Krystalizace .....	36
5	Diskuse .....	37
6	Závěr .....	42
7	Soupis bibliografických citací .....	43

## Seznam použitých zkratk

<b>2-PMPA</b>	kyselina 2 -(fosfonomethyl)pentandiová
<b><sup>3</sup>H-NAAG</b>	N-acetylaspartylglutamát značený tritiem
<b>APS</b>	persulfát amonný
<b>EC</b>	třída enzymu (enzyme class)
<b>EDTA</b>	kyselina ethylendiamintetraoctová
<b>FOLH1</b>	folát hydrolasa
<b>g</b>	gravitační zrychlení
<b>GCPII</b>	glutamátkarboxypeptidasa II
<b>GCPIII</b>	glutamátkarboxypeptidasa III
<b>GPC</b>	gelová permeační chromatografie
<b>HABA</b>	kyselina 2-(4-hydroxybenzenazo) benzoová
<b>mAU</b>	tisícina jednotky absorbance
<b>mGluR3</b>	metabotropní glutamátový receptor 3
<b>Mw</b>	molekulová hmotnost (molecular weight)
<b>MWCO</b>	nejvyšší molekulová hmotnost prostupující membránou (molecular weight cut off)
<b>NAAG</b>	N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát
<b>NAALADasa</b>	N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamátdipeptidasa (N-acetyled- $\alpha$ -linked acidic dipeptidase)
<b>NAALADasa L</b>	N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamátdipeptidasa L (N-acetyled- $\alpha$ -linked acidic dipeptidase-like)
<b>nanoDSF</b>	nanodiferenční skenovací fluorimetrie

<b>PAGE</b>	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
<b>PSMA</b>	pro prostatu specifický membránový antigen (prostate-specific membrane antigen)
<b>rhGCPII</b>	rekombinantní lidská glutamátcarboxypeptidasa II
<b>RPM</b>	počet otáček za minutu (revolutions per minute)
<b>SDS</b>	dodecylsulfát sodný
<b>SgAP</b>	aminopeptidasa ze <i>Streptomyces griseus</i>
<b>T<sub>t</sub></b>	teplota tání
<b>UFLC</b>	ultrarychlá kapalinová chromatografie (ultra fast liquid chromatography)
<b>wtGCPII</b>	glutamátcarboxypeptidasa II divokého typu



# 1 Úvod

Lidská glutamátkarboxypeptidasa II (GCPII, EC 3.4.17.24) je homodimerní membránový glykoprotein II. typu. V lidském organismu je exprimována v různých tkáních, proto byla v závislosti na lokalizaci a funkci studována jako tři různé proteiny.<sup>1</sup> V nervovém systému byla GCPII identifikována jako N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamátdipeptidasa (NAALADasa, N-acetyled- $\alpha$ -linked acidic dipeptidase). Podle substrátu štěpeného v tenkém střevě byla pojmenována jako folát hydrolasa (FOLH1, folate hydrolase). Exprese GCPII v buňkách prostaty byla považována za specifickou pro tuto tkáň, proto byla nazvána pro prostatu specifickým membránovým antigenem (PSMA, prostate-specific membrane antigen). V současnosti je upřednostňován název glutamátkarboxypeptidasa II. Fyziologickými a patofyziologickými funkcemi vyplývajícími z uvedených názvů tohoto proteinu se zabývá první polovina teoretického úvodu. Druhá polovina se zabývá vztahem iontů kovů a molekul proteinů, strukturou koordinačních sfér těchto iontů v proteinech a strukturou GCPII, v jejímž aktivním místě se vyskytují dva zinečnaté ionty, které se účastní její katalytické činnosti. V blízkosti homodimerizačního rozhraní se vyskytuje vápenatý ion, jehož funkce není známá. Cílem experimentální části práce je jeho funkci objasnit pomocí bodových mutací aminokyselin koordinujících tento ion, následné exprese, purifikace a charakterizace těchto mutantů GCPII v porovnání s wtGCPII.

## 2 Teoretická část

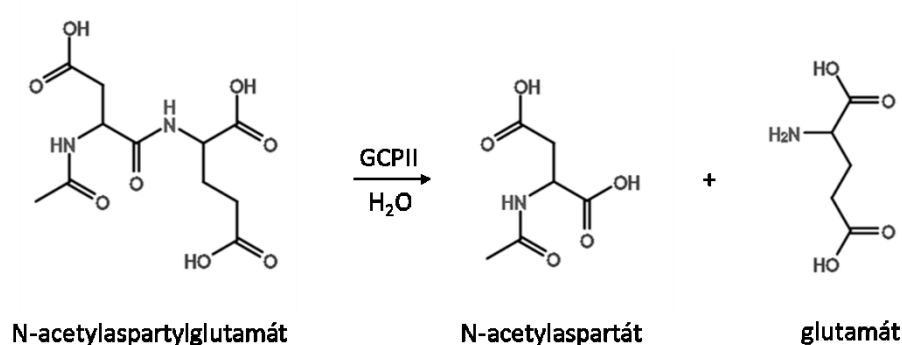
### 2.1 Výskyt GCPII

#### 2.1.1 Fyziologický výskyt GCPII

##### 2.1.1.1 Nervová tkáň

N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát (NAAG) je nejrozšířenějším peptidovým neurotransmiterem savců.<sup>2</sup> Při depolarizaci membrány axonu je NAAG uvolněn do synaptické štěrby a rychle difunduje extracelulárním prostorem, kde se váže na metabotropní glutamátový receptor 3 (mGluR3) exprimovaný na presynaptickém zakončení axonu i na povrchu astrocytů. Vazbou NAAG na mGluR3 axonu je spuštěna signalizační dráha vedoucí ke snížení sekrece neurotransmiterů při následném podráždění. Vazba NAAG na mGluR3 na astrocytech spouští expresi transformujícího růstového faktoru  $\beta$ .<sup>2</sup> Oba tyto děje jsou neuroprotektivní.<sup>3</sup>

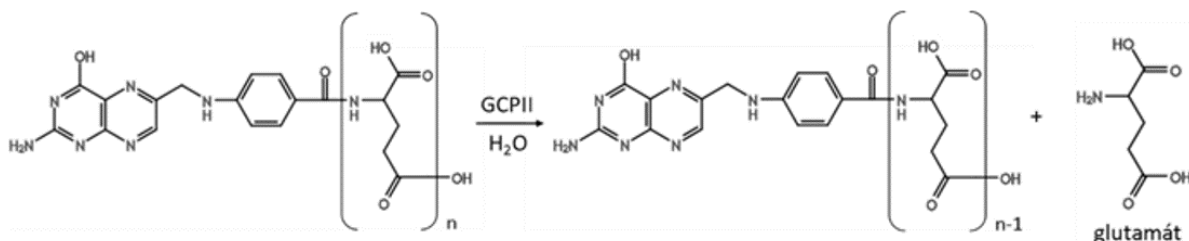
V extracelulárním prostoru je NAAG pomocí GCPII štěpen na N-acetylaspartát a glutamát (Obr. 1).<sup>4</sup> Volný glutamát je důležitým neurotransmiterem a hraje zásadní roli při přenosu nervových signálů v mozku a komunikaci mezi neurony a podpůrnými buňkami (astrocyty, oligodendrocyty). Na druhé straně je neregulovaná produkce glutamátu spojena s patofyziologickými jevy v nervovém systému, neboť jeho zvýšená koncentrace je pro neurony excitotoxická v důsledku hyperaktivace ionotropních glutamátových kanálů. Následkem je nadprodukce oxidu dusnatého, tvorba volných radikálů a narušení homeostáze. Zvýšená koncentrace glutamátu se objevuje při onemocněních jako je amyotrofická laterální skleróza, Alzheimerova choroba, Huntingtonova choroba, Parkinsonova choroba, epilepsie, schizofrenie nebo mozková mrtvice.<sup>4</sup>



Obrázek 1 – Štěpení N-acetylaspartylglutamátu katalyzované GCP II v nervovém systému

### 2.1.1.2 Tenké střevo

Při studiu výskytu GCP II v organismu bylo zjištěno, že se nachází také v proximální části tenkého střeva.<sup>5</sup> V této tkáni je funkce GCP II známa, enzym zde katalyzuje hydrolýzu glutamátu ze směsi folylpoly- $\gamma$ -glutamátů (Obr. 2), což je forma, ve které se folát vyskytuje ve stravě. Tímto způsobem je umožněna absorpce folátu jeho specifickými transportéry, neboť folát může být přenášen přes stěnu střeva až po odštěpení poly- $\gamma$ -glutamátového řetězce.<sup>6</sup>



Obrázek 2 – Štěpení folylpoly- $\gamma$ -glutamátu katalyzované GCP II v tenkém střevě

## 2.1.2 Patofyziologický výskyt GCPII

### 2.1.2.1 Prostata

Ve zdravých buňkách prostaty je exprese GCPII relativně nízká a její fyziologická funkce v této tkáni není známa.<sup>7</sup> S postupující transformací zdravé tkáně prostaty v nádorovou dochází k výraznému zvyšování exprese GCPII, která je výrazná také ve vznikajících metastázách.<sup>8</sup> Vyšší exprese tohoto enzymu může buňkám zajišťovat výhodný zdroj folátu a zvyšovat tak jejich proliferační schopnost.<sup>9</sup> Další možností je zapojení GCPII jako receptoru zatím neznámého ligandu. Jednou z hypotéz je také podpora migrace nádorových buněk a jejich uchycení v místech budoucích metastáz.<sup>10</sup>

### 2.1.2.2 Nově vznikající cévní tkáň nádorů

V cévních epiteliálních buňkách se GCPII fyziologicky neexprimuje.<sup>5</sup> Byla ale pomocí monoklonálních protilátek detekována v epitelu nově vznikajících cévních tkání (neovaskulatuře) karcinomů ledvin, močového měchýře, tlustého střeva, varlat, neuroendokrinních tkání, prsu, jater a plic. Dále byla GCPII detekována také v nenádorové nově vznikající cévní tkáni děložní sliznice, keloidních jizvách, v cévách zásobujících pleurální lištu a srdeční chlopně. Funkce GCPII není známa ani ve fyziologické, ani v patologické neovaskulatuře.<sup>5</sup>

## 2.2 Diagnostické a terapeutické využití GCPII

### 2.2.1 Inhibice GCPII v nervové tkáni

K léčbě neurodegenerativních onemocnění, při kterých je zvýšená koncentrace glutamátu cytotoxická, existuje několik přístupů. Jedním z nich je aplikace antagonistů glutamátových receptorů, mezi které patří memantine používaný při léčbě Alzheimerovy choroby. Léčba má v tomto případě řadu vážných vedlejších účinků.<sup>11</sup> Další možný přístup je zabránění uvolňování glutamátu z presynaptického zakončení pomocí látek blokujících presynaptické sodné kanály.<sup>12</sup>

Lze také využít fakta známá o GCPII v nervovém systému a inhibicí její enzymatické činnosti zabránit štěpení NAAG. Tímto způsobem je udržována vyšší koncentrace NAAG, který má, jak bylo uvedeno výše, neuroprotektivní účinky.<sup>4</sup> Jedním z používaných inhibitorů je kyselina 2-(fosfonomethyl) pentandiová (2-PMPA).<sup>13</sup> Tento inhibitor vykazuje vůči GCPII vysokou selektivitu a jeho inhibiční konstanta byla 300 pmol/l.<sup>14</sup> Na zvířecích modelech byla s využitím PMPA prokázána využitelnost inhibice GCPII pro léčbu neurodegenerativních onemocnění a tudíž je na vývoj nových inhibitorů s vylepšenými farmakokinetickými vlastnostmi kladen velký důraz.<sup>15</sup>

### 2.2.2 GCPII jako PSMA

Rakovina prostaty je ve vyspělých zemích jednou z nejčastějších příčin úmrtí mužů a také nejčastěji diagnostikovanou nekožní formou rakoviny.<sup>9</sup> Díky tkáňově poměrně specifické expresi a lokalizaci na cytoplazmatické membráně představuje GCPII vhodný molekulární cíl pro diagnostiku a terapii prostatických nádorů.<sup>1</sup>

Od roku 1996 je k diagnostice rakoviny prostaty používána monoklonální myší protilátka značená <sup>111</sup>In známá pod názvem ProstaScint<sup>™</sup>.<sup>16</sup> Tato protilátka se váže na intracelulární epitop GCPII a značí pouze mrtvé nádorové buňky.<sup>1</sup> V současné době jsou vyvíjeny nové protilátky proti extracelulárním epitopům GCPII, mezi které patří například protilátka J591 a její deriváty.<sup>17</sup> Pomocí těchto protilátek značených <sup>111</sup>In nebo <sup>89</sup>Zr lze diagnostikovat nejen rakovinu prostaty, ale i metastázy a neovaskulaturu nádorů, ve které je GCPII také exprimována. Stejná protilátka značená radionuklidy <sup>90</sup>Y a <sup>117</sup>Lu je úspěšně používána při β-terapii, silnější protinádorová aktivita se projevovala po aplikaci konjugátu s <sup>117</sup>Lu.<sup>17</sup> Ve fázi výzkumu jsou také konjugáty derivátů protilátky J591 s imunotoxiny.<sup>18</sup>

Další vyvíjené přístupy diagnostiky a terapie jsou založeny na nízkomolekulárních látkách s vysokou afinitou k GCPII, které se rychleji navážou v diagnostikovaných nádorech a vylučují ze zbytku organismu.<sup>19</sup> Patří mezi ně například fosforamidátová peptidomimetika a skupina inhibitorů na bázi močoviny. V současné době probíhá několik desítek klinických studií s cílem optimalizovat veškeré aspekty používání těchto inhibitorů, jako je charakteristika inhibitorů, druh používaného radioizotopu nebo dávkování, pro zobrazování a léčbu rakoviny prostaty.<sup>20,21</sup>

## 2.3 Ionty kovů v proteinech

Ionty kovů hrají nezastupitelnou roli ve všech biologických systémech a jejich přítomnost je nezbytná pro správnou funkci mnoha proteinů.<sup>22</sup> Odhaduje se, že až 30 % proteinů potřebuje ke správné biologické funkci v buňce jeden či více iontů kovů. Nejčastěji to jsou ionty sodíku, draslíku, vápníku, hořčíku, manganu, kobaltu, železa, niklu, zinku a mědi.<sup>23</sup> Zastoupení těchto metaloproteinů se mírně mění v závislosti na druhu organismu a tkáni.<sup>24</sup> Asi polovina z nich obsahuje jeden ion kovu, třetina obsahuje dva nebo tři a 15 % čtyři a více iontů kovů.<sup>25</sup> Zastoupení enzymů, k jejichž funkci je nutná přítomnost iontů kovů, je ještě vyšší než celkově u proteinů. Kolem 40 % všech biokatalytických procesů je zprostředkováváno metaloenzymy.<sup>26</sup>

### 2.3.1 Funkce iontů kovů v proteinech

Ionty kovů plní v proteinech různé funkce.<sup>27</sup> První z nich je funkce strukturní, koordinované ionty stabilizují terciální a kvartérní strukturu v molekulách proteinů. Druhá funkce je zásobní, kovy jsou v proteinech ukládány k dalšímu použití, například k buněčné signalizaci. Třetí funkcí je přenos a uchovávání elektronů. Čtvrtou, velmi důležitou funkcí, je vazba a uvolňování molekul  $O_2$  při transportu v organismu. Dále lze uvést funkci katalytickou. Ionty kovů jsou často součástí aktivního místa enzymu, kde zprostředkovávají vazbu či aktivaci substrátu nebo produktu.<sup>25,27</sup> Všechny tyto funkce jsou umožněny vlastnostmi iontů kovů, jako je jejich kladný náboj zajišťující elektrofilní vlastnosti a umožňující jim chovat se jako Lewisovy kyseliny, dále také stabilita setrvání iontů v různých oxidačních stavech.<sup>22</sup>

### 2.3.2 Koordinace iontů kovů v molekulách proteinů

Koordinací sféra iontů kovů v proteinech zahrnuje ligandy pocházející z hlavního polypeptidového řetězce, z postranních řetězců aminokyselin, z kofaktorů a molekul vody.<sup>27</sup> Energie koordinačně kovalentní vazby je o mnoho vyšší než energie vodíkových můstků, ale je o něco menší než energie jednoduché kovalentní vazby mezi

dvěma uhlíky.<sup>25</sup> Tvorba koordinační vazby může způsobit odchylky od optimální geometrie v proteinu. Donorový atom zaujímá optimální pozici ve vztahu ke koordinovanému iontu a tím může způsobit posun torzních úhlů jednoduchých vazeb do energeticky méně výhodných oblastí.<sup>25</sup> Faktorem, který umožňuje větší flexibilitu aminokyseliny tvořící koordinační vazbu, je typ sousední aminokyseliny v polypeptidovém řetězci. Glycin, který ve flexibilitě není omezován postranním řetězcem, se tak v sousedství takových aminokyselin vyskytuje s dvakrát větší četností než ve zbytku řetězce. Více než 50 % takových případů náleží úsekům smyček s malým poloměrem a koordinačním číslem vyšším než pět.<sup>25</sup>

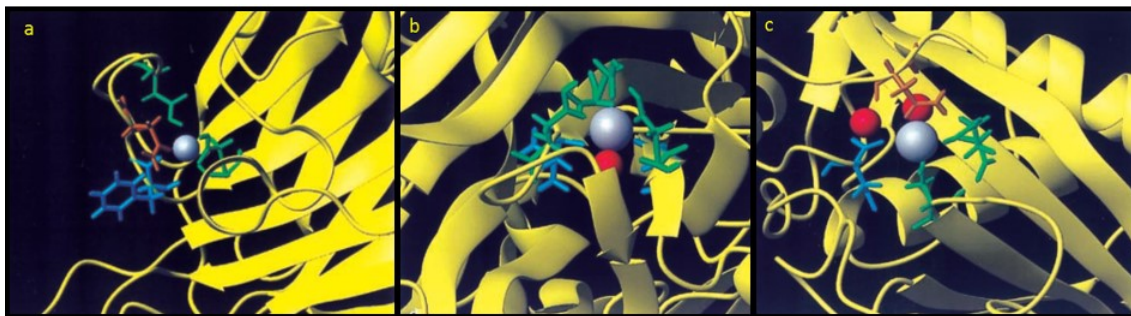
Mezi ligandy pocházejícími z polypeptidového řetězce, kterými jsou kovy koordinovány, jsou jak karbonylové skupiny hlavního řetězce, tak i postranní řetězce aminokyselin, které obsahují atomy kyslíku, dusíku nebo síry schopné poskytovat elektronový pár pro koordinační vazbu.<sup>27</sup> Nejčastějšími ligandy jsou atomy kyslíku v karboxylátové skupině aspartátu a glutamátu, atom síry v cysteinu a dusíky v imidazolovém kruhu histidinu.<sup>23</sup> O něco méně jsou jako donory zastoupeny aminokyseliny asparagin, serin, threonin, methionin a tyrosin.<sup>23</sup> Donory koordinačních vazeb zprostředkovávající vazbu kovu v proteinu mohou být také organické kofaktory jako například tetrapyrrolová jádra v hemoproteinech.<sup>23,28</sup> Významné jsou také molekuly vody, které často slouží jako doplňující ligand koordinačního polyedru nebo jako přemostění vazby dalšího kofaktoru. V případě iontů kovů alkalických zemin mohou molekuly vody tvořit i celou první koordinační vrstvu, kladný náboj iontu se pak rozprostírá v celém komplexu.<sup>23</sup> V dalších koordinačních vrstvách se pak vyskytují záporně nabitě postranní řetězce aspartátu či glutamátu, které zajišťují celkovou neutralitu.<sup>23</sup>

### **2.3.2.1 Koordinace $\text{Ca}^{2+}$ iontu v molekule proteinu**

Vápenatý ion se v molekulách proteinů vyskytuje poměrně často. Nejběžněji v nich slouží k udržení správné konformace a zvýšení stability.<sup>29</sup> Rozšířenou biologickou funkcí vápenatých iontů je také signalizace v buňce, kde jejich přítomnost způsobuje změnu konformace proteinů vázících vápník v závislosti na momentální koncentraci

v cytoplasmě.<sup>29,30</sup>  $\text{Ca}^{2+}$  ion také přispívá k udržování redoxního potenciálu volných radikálů v hemoproteinech.<sup>29</sup>

Vazebná místa vápenatého iontu v proteinech lze rozdělit do tří základních skupin podle úseků polypeptidového řetězce, ze kterých pocházejí koordinující aminokyseliny (Obr. 3).<sup>25,29</sup> V první skupině pochází všechny donorové aminokyseliny z krátkého úseku polypeptidového řetězce.<sup>29</sup> K této skupině patří velmi rozšířený EF-hand motiv, v němž není celková vzdálenost mezi donory větší než dvacet aminokyselin v primární struktuře proteinu.<sup>25</sup> Ve druhé skupině je vápník koordinován aminokyselinami ze dvou sekvenčně vzdálených úseků. Do této skupiny patří vazebné místo  $\text{Ca}^{2+}$  v GCPII (Str. 14; Obr. 6), které je tvořeno dvěma sekvenčně vzdálenými dvojicemi donorových aminokyselin.<sup>29</sup> Třetí skupinu pak tvoří proteiny, ve kterých je každá aminokyselina poskytující donor v polypeptidovém řetězci vzdálená od ostatních.<sup>29</sup>

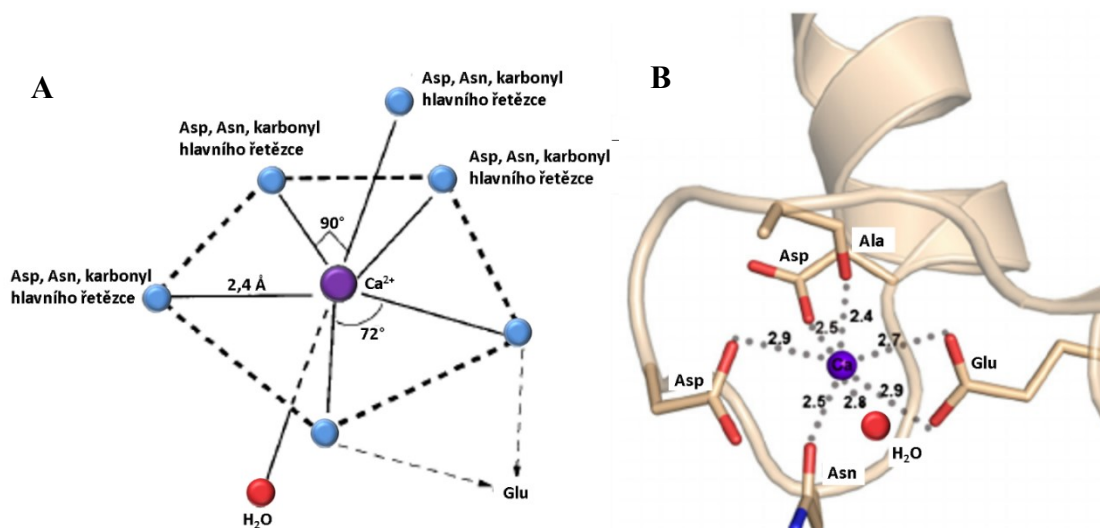


**Obrázek 3 – Příklady  $\text{Ca}^{2+}$  vazebných míst I., II. a III. skupiny.** Převzato z ref. (29)

Na obrázku jsou vazebná místa vápenatého iontu (šedý) patřící do různých skupin, zelenou barvou jsou zobrazeny aspartát a glutamát, oranžovou asparagin a glutamin, modrou aminokyseliny koordinující  $\text{Ca}^{2+}$  karbonylem hlavního řetězce, červeně jsou vyznačeny molekuly vody. a) lektin,  $\text{Ca}^{2+}$  vazebné místo patřící do I. skupiny (Asp129, karbonyl Phe131, Asn 133, Asp136), b) aminooxidasa, II. skupina (Asp533, karbonyl Leu534, Asp535, Asp678, karbonyl Ala679, voda), c) adamalysin, III. skupina (Glu9, Asp93, karbonyl Cys197, Asn200, voda).<sup>29</sup>

Nejrozšířenějším  $\text{Ca}^{2+}$  vazebným motivem je EF-hand (Obr. 4), ve kterém je vápník koordinován v uspořádání pentagonální bipyramidy (Obr. 4). Tento motiv se objevuje v mnoha strukturně i funkčně naprosto odlišných proteinech.<sup>31</sup> Jeho struktura je složená ze smyčky obklopené dvěma helixy (E a F), ve které je  $\text{Ca}^{2+}$  koordinován sedmi atomy kyslíku, z nichž jeden pochází z molekuly vody, dva z karbonylů hlavního řetězce a další čtyři z postranních řetězců aspartátu, asparaginu a glutamátu. Glutamát jako jediný pochází z F-helixu, ostatní donory pochází z aminokyselin ve smyčce.<sup>31</sup>





**Obrázek 4 – A – schéma pentagonální bipyramidy v EF-hand motivu, B – příklad struktury EF-hand motivu**  
(Převzato z: [www.researchgate.net/figure/264234620\\_fig2\\_Figure-2-EF-hand-motif-1-of-EhCaBP1-showing-the-heavy-metal-coordination-A-Calcium](http://www.researchgate.net/figure/264234620_fig2_Figure-2-EF-hand-motif-1-of-EhCaBP1-showing-the-heavy-metal-coordination-A-Calcium), 24.4.2017)

Vápenatý ion se v molekule proteinu často vyskytuje blízko povrchu molekuly koordinován donory pocházejícími ze smyčky nebo ohybu.<sup>29</sup> V případě donorů, které jsou součástí sekundárních struktur, jsou preferovány aminokyseliny helikálních struktur oproti  $\beta$ -strukturám.<sup>29</sup> Nejčastěji jsou donory koordinačních vazeb atomy kyslíku karboxylátů v postranních řetězcích aspartátu a glutamátu,<sup>32</sup> které svým záporným nábojem kompenzují kladný náboj iontu nebo ho dokonce přebíjejí. To je často alespoň částečně kompenzováno vodíkovými můstky mezi NH skupinami hlavního řetězce a kyslíky karboxylátů.<sup>29</sup> Dalšími obvyklými donory jsou molekuly vody a postranní řetězce asparaginu, glutaminu threoninu a serinu<sup>32</sup> a méně často pak karbonyly hlavního řetězce.<sup>29</sup> První koordinační sféra vápenatých iontů, stejně jako hořečnatých, je zřejmě tvořena pouze kyslíky a to i u amidových skupin asparaginu a glutaminu.<sup>23</sup> Vysoké afinity dosahuje koordinace vápníku posttranslačně modifikovaným glutamátem s připojenou další karboxylátovou skupinou na  $\gamma$ -uhlíku.<sup>32</sup>

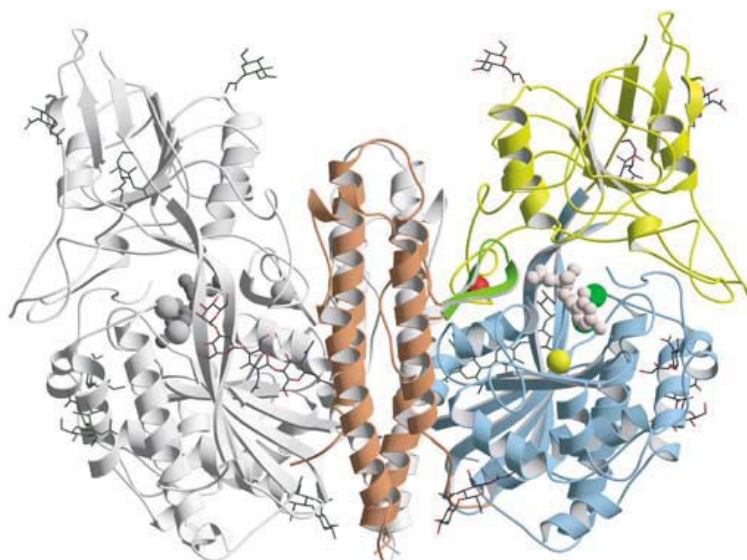
Vazebná místa  $\text{Ca}^{2+}$  jsou nepravidelná a mají velkou variabilitu v typu ligandů i velikostech vazebných úhlů,<sup>31</sup> nicméně jsou na mapě elektronové hustoty dobře rozpoznatelná díky vysokému koordinačnímu číslu (nejčastěji šest nebo sedm)<sup>23,29</sup> a charakteristické vzdálenosti ligandů, která se pohybuje v rozmezí 2,37-2,43 Å pro atomy kyslíku z aminokyselin a 2,42-2,49 Å pro atomy kyslíku z molekul vody.<sup>23</sup> Koordinační

sféra vápenatého iontu je podobná koordinačním sférám některých lanthanoidů.<sup>29</sup> Do vazebných míst vápenatého iontu se tedy mohou vázat ionty  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$  nebo  $\text{Yb}^{3+}$ . Tato možnost je využitelná při identifikaci těchto míst a při další charakterizaci  $\text{Ca}^{2+}$  vazebných proteinů pomocí spektroskopie, krystalografie a nukleární magnetické rezonance.<sup>29</sup>

## 2.4 Struktura GCPII

GCPII je tvořena krátkou N-terminální cytoplasmatickou částí (19 aminokyselin), transmembránovou oblastí (24 aminokyselin) a extracelulární částí (707 aminokyselin), ve které se nachází aktivní místo.<sup>33</sup> Na povrchu této části je deset potenciálních N-glykosylačních míst, na sedmi z nich jsou glykosylace přítomny.<sup>34</sup> GCPII se řadí do peptidasové rodiny M28, do které byla zařazena na základě aminokyselinové sekvence.<sup>35</sup> Vyřešení 3D struktury enzymu pomocí krystalografie ukázalo, že v aktivním místě obsahuje dva zinečnaté ionty stejně jako ostatní peptidasy této rodiny.<sup>34</sup>

Extracelulární část GCPII se skládá ze tří domén (Obr. 5), apikální (aminokyseliny 117-351), proteasové (aminokyseliny 57-116 a 352-590) a C-terminální (aminokyseliny 591-750).<sup>34</sup> Všechny tři domény se podílejí na vazbě substrátu. Aktivní místo se nachází mezi těmito doménami a vede k němu asi 20 Å dlouhý tunel od povrchu proteinu. Oba zinečnaté ionty jsou koordinovány kyslíky postranního řetězce Asp387 a zároveň jednou molekulou vody nebo hydroxidovým aniontem. Tetraedrální uspořádání doplňují pro katalytický zinečnatý ion postranní řetězce His377 a Asp453 a pro kokatalytický Glu425 a His553. V prostoru aktivního místa je také v oktaedrálním uspořádání vázán chloridový ion, který udržuje ve správné konformaci Arg534 potřebný k vazbě substrátu.<sup>34</sup>



**Obrázek 5 – Struktura extracelulární části homodimeru GCPII.** Převzato z ref. (34)

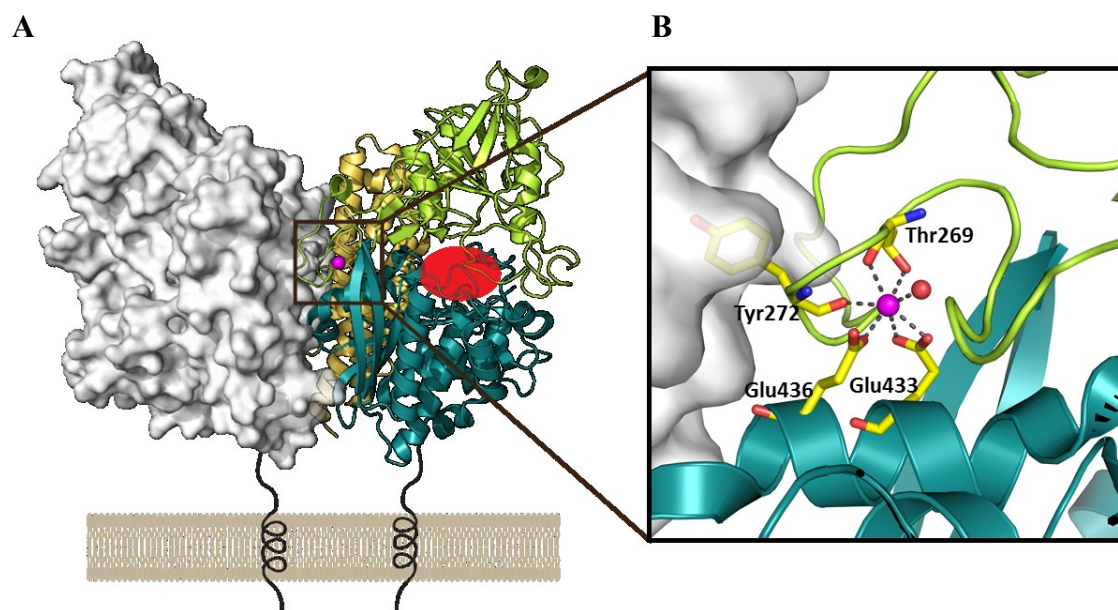
3D struktura GCPII, jeden monomer je zobrazen šedě, ve druhém monomeru je proteasová doména zobrazena modře, apikální doména žlutě a C-terminální doména hnědě. Zinečnaté ionty jsou vyznačeny zeleně, chloridový ion žlutě a vápenatý ion červeně. Molekula inhibitoru vázaná v aktivním místě je béžová.

Na dimerizačním rozhraní se stýká C-terminální doména jednoho monomeru s apikální a proteasovou doménou druhého homodimeru na celkové ploše 2457 Å<sup>2</sup>. Dále zde dochází ke tvorbě dvou solných můstků mezi Arg662 a Asp666 opačných monomerů. Na rozhraní také dochází k hydrofobní interakci mezi Tyr277 a glykosylací na Asn638 druhého monomeru.

#### 2.4.1 Vazebné místo Ca<sup>2+</sup> iontu v GCPII

Vápenatý ion je přítomný ve všech publikovaných krystalografických strukturách lidské GCPII. Je zde koordinován karboxylátovými skupinami Glu433 (bidentátně) a Glu436 (monodentátně) proteasové domény, Thr269 (hydroxylová skupina a karbonyl hlavního řetězce) a Tyr272 (karbonyl hlavního řetězce), které jsou součástí apikální domény (Obr. 6; B). Koordinační sféru pentagonální bipyramidy doplňuje kyslík molekuly vody. Ca<sup>2+</sup> ion se vyskytuje v blízkosti dimerizačního rozhraní a zároveň mezi apikální (světle zelená) a proteasovou (tmavě zelená) doménou jednoho monomeru (Obr. 6; A). Od zinečnatých iontů v aktivním místě enzymu je Ca<sup>2+</sup> ion vzdálen 20 Å, takže se zřejmě přímo neúčastní katalytické aktivity. Jeho role je pravděpodobně

stabilizační, protože pomocí koordinačních interakcí spojuje apikální a proteasovou doménu.



**Obrázek 6 – Struktura GCPII a detail vazebného místa vápenatého iontu**

Panel A: Homodimer GCPII ukotvený v membráně se znázorněným iontem vápníku (fialový bod), aktivní místo enzymu je označeno červeným oválem. Panel B: Detail koordinační sféry vápenatého iontu. Atomy uhlíku koordinujících aminokyselin jsou zobrazeny žlutě, atomy kyslíku červeně a molekula vody je zobrazena jako červený bod. Koordinace vazby jsou reprezentovány přerušovanou čarou.

## 3 Experimentální část

### 3.1 Použitý materiál

#### **Bachem AG, Švýcarsko**

N-acetylaspartylglutamát (NAAG)

#### **Bio-Rad Laboratories, Inc., USA**

Stacionární fáze iontově výměnné chromatografie AG® 1-X8, formate form

#### **Carl Roth GmbH + Co. KG, Německo**

Scintilační roztok Rotiszint ® eco plus

#### **Crystalgen, Inc., USA**

Krystalyzační deska SuperClear 24 Well Plate

#### **GE Healthcare, USA**

Kolona pro preparativní gelovou permeační chromatografii Superdex 200 Increase 10/300 GL

#### **Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Německo**

Pasteurovy pipety

#### **IBA GmbH, Německo**

Stacionární fáze Strep-Tactin® Superflow pro afinitní chromatografii, D-Desthiobiotin,

#### **Jena Bioscience GmbH, Německo**

Silikonizovaná krystalizační krycí skříčka, 22 mm

**Lach-Ner, s. r. o., Česká republika**

Glycin, HCl, kyselina octová, NaCl, NaOH

**Millipore corp., USA**

Filtrační membrána Millipore Pellicon XL Filter PXB050A50 Biomax 50k, 50cm<sup>2</sup>;  
koncentrační kolonka Amicon® Ultra 0.4mL Filters for Protein Purification and  
Concentration

**NanoTemper Technologies GmbH, Německo**

Kapiláry PR-C002 Prometheus NT.48 Series nanoDSF Grade Standard

**New England Biolabs Inc., USA**

Roztok – 30% Akrylamid 0,8% N,N'-Methylenbisakrylamid

**PerkinElmer, Inc., USA**

<sup>3</sup>H-N-acetylaspartylglutamát (<sup>3</sup>H-NAAG)

**Qiagen, Německo**

Transfekční činidlo Effectene

**La Roche Ltd., Švýcarsko**

Tablety inhibitorů proteas cOmplete™, EDTA-free

**Showa Denko K.K., Japonsko**

Kolona pro analytickou gelovou permeační chromatografii OHpak SB-804 HQ

## **Sigma-Aldrich Co., USA**

2-merkaptoethanol; Brilliant Blue G; bromfenolová modř; dodecylsulfát sodný; 2-(4-hydroxybenzenazo) benzoová kyselina; kyselina mravenčí; NaN<sub>3</sub>; Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin; polyethylenglykol 3350; persulfát amonný; 5/4 pentaerythritol propoxylát; Tris-HCl; kit markerů molekulových hmotností (Gel Filtration Markers Kit for Protein Molecular Weights 29,000-700,000 Da)

## **Thermo Scientific, USA**

Dialyzační střevo SnakeSkin Dialysis Tubing, 7 000 MWCO; marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10-180 kDa; médium pro S2 buňky Gibco™ Sf-900™ II SFX; plazmid pMT/BiP/V5-His A pro expresi v S2 buňkách; Schneiderovy S2 buňky

## **3.2 Použité přístroje**

### **Centrifugy**

Centrifuge 5430 R, Eppendorf Corp., Německo; Avanti J-30I High-Performance Series, Beckman Coulter Inc., USA

### **Elektroforetický zdroj napětí**

ENDURO™ 250V power supply, Labnet International, Inc., USA

### **Fluorimetr pro nanoDSF**

Prometheus NT.48, NanoTemper Technologies GmbH, Německo

### **HPLC systémy**

Shimadzu UFLC prominence, LC-20AD liquid chromatograph, Shimadzu Corp., Japonsko; NGC™ 10 Medium-Pressure Chromatography Systems, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA

### **Nástavec pro spektrofotometr**

LabelGuard™ Microliter Cell, Impln GmbH, Německo

## **Spektrofotometr**

NanoPhotometer™ UV/Vis Spectrophotometer, Implen GmbH, Německo

## **Tangenciální průtokový koncentrátor**

Labscale TFF Systém, Millipore Corp., USA

## **3.3 Použité metody**

### **3.3.1 Kultivace Schneiderových S2 buněk *Drosophila melanogaster***

*Kompletní médium:* Gibco™ Sf-900™ II SFX (Merck Millipore), (dále jen Sf900II médium), 10% fetální hovězí sérum

Schneiderovy S2 buňky (Invitrogen), buněčná linie odvozená z embryonálních buněk *Drosophila melanogaster*, byly skladovány v kapalném dusíku. Alikvot buněk byl rychle rozmražen při 37 °C a povrch vialky byl otřen 70% ethanolem. Buňky byly přeneseny do 60mm misky obsahující 5 ml kompletního média a inkubovány 16 h při 22 °C. Poté byla suspenze buněk centrifugována 3 min při 500 g, supernatant byl odebrán a nahrazen 5 ml kompletního média. Buňky byly dále inkubovány při 22 °C až do dosažení hustoty 6-20 x 10<sup>6</sup> buněk/ml (3-4 dny), která byla určena pomocí Bürkerovy komůrky. Poté byly buňky přichycené na dně misky a jejich shluky v roztoku resuspendovány pomocí pipety, naředěny na hustotu 2 x 10<sup>6</sup> buněk/ml pomocí kompletního média, přeneseny do nové 6mm misky a inkubovány při 22 °C opět do dosažení hustoty 6-20 x 10<sup>6</sup> buněk/ml.

### **3.3.2 Transfekce a selekce Schneiderových S2 buněk**

Transfekce byla provedena pomocí transfekčního činidla Effectene (Qiagen), které obsahuje TE pufr, EC pufr, Enhancer a Effectene. Za přítomnosti Enhanceru tvoří Effectene s transfekovanou DNA komplexy s micelárními strukturami, což umožňuje DNA efektivní vstup do buňky.



Rekombinantní DNA použitá pro transfekci je založena na sekvenci pMT/BiP/V5-His A plazmidu (Invitrogen), který obsahuje metalothioneinový promotor a N-koncovou BiP sekvenci pro sekreci exprimovaného proteinu do média.<sup>36</sup> Do tohoto expresního plazmidu byla zaklonována sekvence pro StrepII-FLAG-TEV-StrepII-TEV připojená k N-konci sekvence extracelulární části rhGCPII (aminokyseliny 44-750) s bodově cílenými mutacemi (Str. 27; Tab. 1). Purifikační značky Strep II a FLAG jsou aminokyselinové sekvence používané k afinitní purifikaci rekombinantních proteinů. TEV je aminokyselinová sekvence rozpoznávaná proteasou pocházející z viru tabákové mozaiky. Spolu s tímto plazmidem byl do buněk vnášen také plazmid pCoBlast pro selekci transfekovaných buněk blasticidinem.

K transfekci ve dvanácti jamkové destičce bylo použito 0,6 ml buněčné suspenze ( $1 \times 10^6$  S2 buněk/ml) v kompletním médiu. 0,5  $\mu$ g expresního plazmidu pro GCPII a 0,03  $\mu$ g selekčního plazmidu pCoBlast bylo smícháno s EC pufrem na výsledný objem 50  $\mu$ l. K roztoku byly přidány 4  $\mu$ l enhanceru. Směs byla inkubována 5 min při pokojové teplotě. Ke směsi bylo přidáno 12,5  $\mu$ l Effectenu, vše bylo řádně promícháno pomocí pipety a inkubováno po dobu 5-10 min při pokojové teplotě.

Z buněčné kultury bylo opatrně odebráno 0,3 ml média. Stejný objem kompletního média byl přidán ke směsi obsahující rekombinantní DNA, směs byla dvakrát promíchána pipetou a ihned po kapkách přidána k buněčné kultuře, která byla poté inkubována 48 h při 22 °C. Dále bylo 0,4 ml média z kultury vyměněno za 0,5 ml kompletního média s blasticidinem o koncentraci 40  $\mu$ g/ml. Každé tři dny bylo kompletní médium s blasticidinem odsáto a nahrazeno novým.

### **3.3.3 Exprese mutantních forem GCPII v Schneiderových S2 buňkách**

Vyselektované S2 buňky byly postupně expandovány do Sf900™ II média ve 500ml Erlenmeyerově baňce (150 ml média) a následně ve 2l Erlenmeyerově baňce (700 ml média). Inkubace probíhala při 27 °C a třepání 120 RPM. Indukce exprese ve 2l Erlenmeyerově baňce byla provedena přidávkem 7,5 ml roztoku síranu měďnatého o koncentraci 70 mmol/l při hustotě buněk  $2 \times 10^6$  /ml a buňky byly dále inkubovány při 27 °C, třepání 120 RPM. Při hustotě buněk  $30 \times 10^6$  ml<sup>-1</sup> (po 5-7 dnech) bylo médium centrifugováno při 500 g, 15 min. Supernatant byl odebrán a znovu centrifugován při

10 000 g, 15 min. Supernatant byl znovu odebrán, byla v něm rozpuštěna tableta inhibitorů proteáz (cOmplete, EDTA-free, Roche Diagnostics GmbH) a byl skladován při -80 °C.

### **3.3.4 Tangenciální průtoková filtrace**

*Ekvilibrační pufr:* 100 mmol/l Tris-HCl, 150 mmol/l NaCl, pH 8.0

Při tangenciální průtokové filtraci dochází k dělení molekul podle jejich velikosti pod tlakem působícím na polopropustnou membránu s definovanou velikostí pórů pod ostrým úhlem.

SF900II médium obsahující rekombinantní protein bylo centrifugováno při 30 000 g, 15 min, 4 °C. Supernatant byl přelit do tangenciálního koncentrátoru (LabScale TFF System, Merck Millipore) s filtrační kazetou (Millipore Pellicon XL Filter PXB050A50 Biomax 50k Filtration Membrane 50cm<sup>2</sup>, Merck Millipore) promytou ekvilibračním pufrem. Přístroj byl spuštěn, koncentrování probíhalo při teplotě 4 °C a bylo ukončeno po snížení objemu média na 50 ml (asi po 24 h).

### **3.3.5 Dialýza**

*Ekvilibrační pufr:* 100 mmol/l Tris-HCl, 150 mmol/l NaCl, pH 8.0

Pro převedení rekombinantního proteinu do ekvilibračního pufru s optimálními vlastnostmi pro streptaktinovou afinitní chromatografii byla použita dialýza. Přes semipermeabilní membránu s póry o definované maximální molekulové hmotnosti látek, pro které je membrána propustná, mohou volně procházet malé molekuly. Dochází tedy k vyrovnání koncentrací těchto molekul na obou stranách membrány.

Zakonzentrované médium s rekombinantním proteinem bylo centrifugováno při 30 000 g při 4 °C, poté dialyzováno ve 2 l ekvilibračního pufru po dobu 16 h v dialyzačním střevě (SnakeSkin Dialysis Tubing, 7 000 MWCO, ThermoFisher Scientific) za stálého míchání magnetického míchadla.

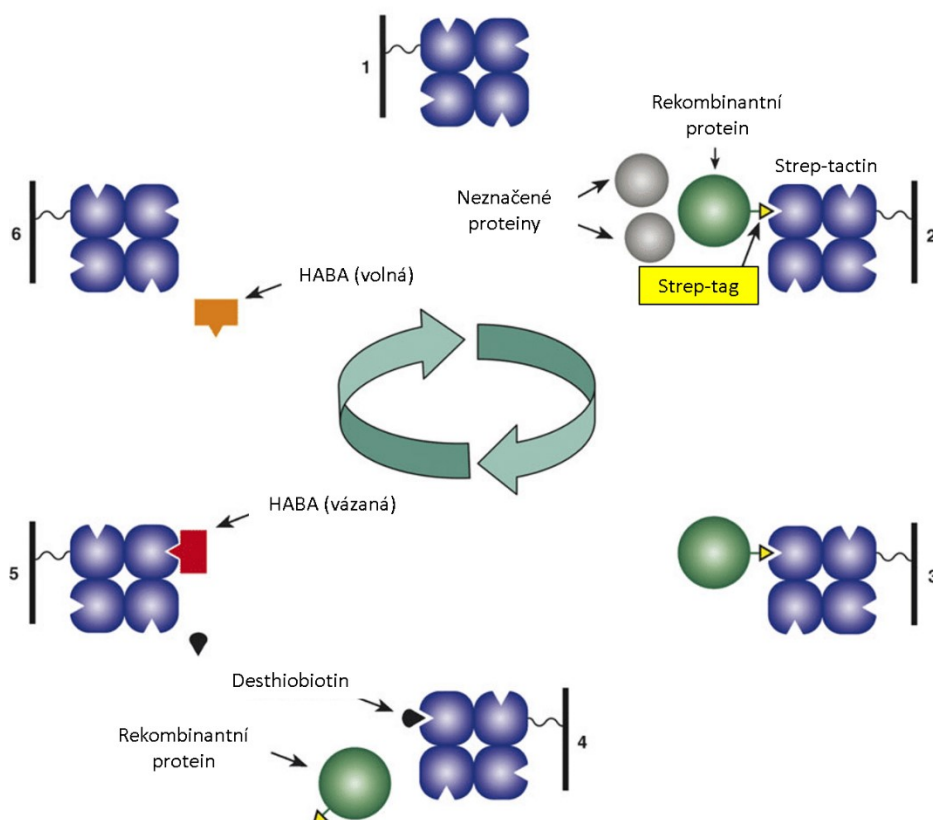
### 3.3.6 Afinitní chromatografie

*Ekvilibrační pufr:* 100 mmol/l Tris-HCl, 150 mmol/l NaCl, pH 8.0

*Eluční pufr:* 100 mmol/l Tris-HCl, 150 mmol/l NaCl, 3 mmol/l desthiobiotin, pH 8.0

*Regenerační pufr:* 100 mmol/l Tris-HCl, 150 mmol/l NaCl, 3 mmol/l HABA, pH 10,4

Afinitní chromatografie je metoda používaná pro oddělení jednoho druhu molekul nebo skupiny molekul se stejným afinitním značením z komplexní směsi. Na stacionární fázi je chemicky navázaný ligand, který specificky interaguje s cílovými molekulami. V tomto případě je imobilizovaným ligandem rekombinantní derivát streptavidinu Strep-Tactin, který váže Strep-tag na N-konci purifikovaného rekombinantního proteinu.<sup>37</sup> Purifikovaný protein je po promytí kolony vytěsněn z komplexu pomocí desthiobiotinu, který má k ligandu vyšší afinitu (Obr. 7).



Obrázek 7 – Cyklus purifikace pomocí streptaktinové afinitní chromatografie, (Převzato z ref. 38)

Po dialýze byl koncentrát média znovu centrifugován při 30 000 g, 4 °C, a nastříkovan na ekvilibračním pufrem promytou 1ml streptaktinovou kolonu (Strep-

Tactin® Superflow, IBA) průtokem 1 ml/min.<sup>39</sup> Kolona se zachyceným rekombinantním proteinem byla promyta ekvilibračním pufrem. Průběh purifikace byl sledován měřením absorbance při 280 nm, promývací krok byl ukončen po dosažení neměnné hodnoty absorbance, poté byly molekuly rekombinantního proteinu uvolněny ze stacionární fáze pomocí elučního pufru a sbírány jako dvě 5ml frakce s rekombinantním proteinem. Kolona byla promyta regeneračním pufrem a 0,5mol/l roztokem hydroxidu sodného.

### **3.3.7 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)**

*Vzorkový pufr:* 250 mmol/l Tris-HCl, 10 % (w/w) SDS, 30 % (V/V) glycerol, 0,75 mol/l  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,3 mmol/l bromfenolová modř, pH 6,8

*Elektrodový roztok:* 25 mmol/l Tris-HCl, 200 mmol/l glycin, 0,1% (w/w) SDS

*Barvicí roztok:* 50 mg/l Brilliant Blue G, 3 ml/l kyselina octová

*Zaostřovací gel:* 4,87% (w/w) akrylamid, 0,13% (w/w) N,N'-Methylenbisakrylamid, 0,1% (w/w) APS, 0,1% (V/V) TEMED, 125 mmol/l Tris-HCl, 0,1 % (w/w) SDS, pH 6,8

*Separací gel:* 9,86% (w/w) akrylamid, 0,13% (w/w) N,N'-Methylenbisakrylamid, 0,1% (w/w) APS, 0,1% (V/V) TEMED, 125 mmol/l Tris-HCl, 0,1% (w/w) SDS, pH 8,8

Při SDS-PAGE je ke vzorku proteinu přidán vzorkový pufr obsahující dodecylsulfát sodný (SDS), jeho pomocí a za zvýšené teploty jsou proteiny denaturovány a jejich hydrofobní části agregovány s SDS.<sup>40</sup> Tím získávají uniformní záporný náboj detergentu úměrný délce polypeptidového řetězce a jejich pohyblivost v zesíťovaném gelu v elektrickém poli tedy závisí pouze na jejich molekulové hmotnosti. Pro redukci disulfidických můstků je do vzorkového pufru přidáván  $\beta$ -merkapt ethanol.

Pro vizualizaci výsledku afinitní chromatografie byla použita SDS-PAGE. Roztoky pro elektroforézu byly vytvořeny smísením analyzovaných vzorků se vzorkovým pufrem v poměru 4:1, roztoky byly denaturovány v suché lázni při 95°C po dobu 5 min. 12,5  $\mu$ l takto připravených roztoků bylo pipetováno do jamek zaostřovacího polyakrylamidového gelu navazujícího na separací gel vloženého do elektroforetické soupravy naplněné elektrodovým roztokem, do další jamky byl pipetován 1  $\mu$ l markeru

(PageRuler™ Prestained Protein Ladder, ThermoFisher Scientific). Dělení proteinů na gelu probíhalo při napětí 150 V po dobu 1,5 h. Poté byl gel vyjmut z aparatury, vložen do deionizované vody a zahříván v mikrovlnné troubě po dobu 1 min, proces se třikrát zopakoval za výměny deionizované vody, poté byl gel vložen do barvicího roztoku, znovu zahříván 1 min v mikrovlnné troubě. V tomto roztoku byl poté ponechán na kývačce po dobu 1 h při pokojové teplotě. Barvicí roztok byl vyměněn za deionizovanou vodu. Po dostatečném odbarvení pozadí byl gel vyfotografován na přístroji ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

### **3.3.8 Preparativní gelová permeační chromatografie**

*TBS pufr*: 50 mmol/l Tris-HCl, 155 mmol/l NaCl, pH 7,4

Gelová permeační chromatografie (GPC) rozděluje molekuly na základě jejich rozdílného hydrodynamického objemu, který je přibližně přímo úměrný molekulové hmotnosti. Náplň kolony je tvořena částicemi s přesně definovanou velikostí pórů, do kterých pronikají analyzované molekuly.<sup>41</sup> Velké molekuly, které neproniknou do pórů náplně, nejsou na koloně zadržovány a jsou eluovány s mrtvým objemem kolony. Molekuly pronikající do pórů náplně jsou eluovány podle klesajícího hydrodynamického objemu.<sup>41</sup>

Eluční frakce z afinitní chromatografie byly spojeny a koncentrovány na objem 0,5 ml v koncentrační kolonce (Amicon® Ultra 0.4mL Filters for Protein Purification and Concentration, Merck Millipore) s membránou nepropustnou pro molekuly s Mw větší než 50 kDa, poté byly v mikrozkuhavce centrifugovány při 30 000 g, 15 min. Takto připravený roztok byl nastříkovan na chromatografickou kolonu Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) ekvilibrovanou pomocí TBS pufru zapojenou v přístroji NGC™ 10 Medium-Pressure Chromatography Systems (Bio-Rad). Celý chromatografický program probíhal při průtoku 1 ml/min s TBS pufrém jako mobilní fází. V průběhu separace byla sledována absorbance při 280 nm, při překročení 10 mAU byly automaticky sbírány frakce o objemu 0,5 ml, které byly následně analyzovány pomocí SDS-PAGE (viz. 3.3.7 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu).

### 3.3.9 Stanovení koncentrace rhGCPII

Koncentrace purifikovaných mutantů GCPII byla stanovena pomocí přímé spektrofotometrie při 280 nm. Při této vlnové délce absorbují postranní skupiny tryptofanu a tyrosinu. Díky známému měrnému absorpčnímu koeficientu, který je pro rhGCPII 1,4 ml/(mg.cm), byla koncentrace proteinu vypočtena přímo z Lambertova-Beerova zákona.

Ke stanovení byl použit spektrofotometr (NanoPhotometer™ UV/Vis Spectrophotometer, Implen GmBH) s nástavcem (LabelGuard™ Microliter Cell, Implen GmBH). Pro stanovení nulové hodnoty absorbance byl použit TBS pufr. Stanovení bylo provedeno na 4 µl roztoku proteinu, změřená absorbance byla dosazena do vzorce:

$$c = \frac{A}{\epsilon \cdot l}$$

V rovnici:  $c$  [mg/ml] je koncentrace proteinu,  $A$  je absorbance při 280 nm,  $\epsilon$  [ml/mg.cm] je měrný absorpční koeficient a  $l$  [cm] je dráha paprsku procházející roztokem.

### 3.3.10 Radiometrické měření aktivity

*Roztok substrátu:* 250 nmol/l  $^3\text{H}$ -NAAG, 4750 nmol/l NAAG

*TBS pufr:* 10 mmol/l Tris-HCl, 155 mmol/l NaCl, pH 7,4

*Stop pufr:* 200 mmol/l  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 2mmol/l  $\beta$ -merkapt ethanol, pH 7,4

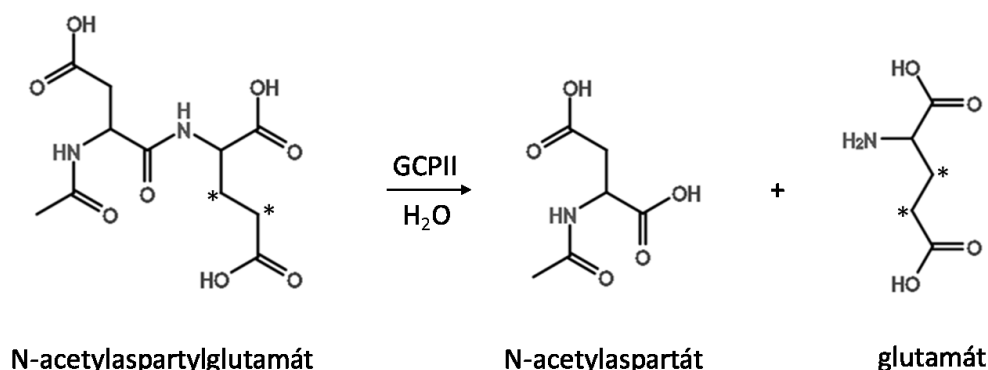
*Stacionární fáze iontové výměnné chromatografie:* AG® 1-X8 Anion Exchange Resin, formate form (Bio-Rad)

*Eluční roztok:* 1 mol/l kyselina mravenčí

Aktivita mutantů GCPII byla změřena pomocí radioaktivně značeného substrátu N-acetylaspartylglutamátu (NAAG),<sup>36</sup> radioaktivní tritium bylo navázáno na glutamátu na uhlících označených hvězdičkou (Obr. 8). Naštěpený produkt byl oddělen od substrátu pomocí iontové výměnné chromatografie.

Do reakce bylo pipetováno 45 µl TBS pufru obsahujícího 1,1; 0,11 a 0,011 µg/ml enzymu, tato směs byla inkubována 10 minut při 37 °C a třepání 300 RPM. Dále bylo do

reakce přidáno 45  $\mu$ l roztoku substrátu nebo 45  $\mu$ l padesátkrát zředěného roztoku substrátu v TBS pufru, reakce probíhala 20 min za stejných podmínek. Reakce byla zastavena přidáním 120  $\mu$ l studeného stop pufru.



Obrázek 8 – Reakce štěpení N-acetylaspartylglutamátu na N-acetylaspartát a glutamát katalyzovaná GCPII

Suspenze stacionární fáze pro iontově výměnnou chromatografii byla při pokojové teplotě promyta deionizovanou vodou. Za stálého míchání byl do Pasteurovy pipety se skleněnou kuličkou pipetován 1 ml suspenze stacionární fáze, po usazení byla stacionární fáze promyta 1,2 ml deionizované vody. Na takto připravenou kolonu bylo pipetováno 100  $\mu$ l reakční směsi. Pod kolonu byla postavena vialka obsahující 3 ml scintilačního roztoku (Rotiszint® eco plus, Carl Roth), glutamát byl eluován pomocí 1,2 ml elučního roztoku do vialky.

### 3.3.11 Nanodiferenční skenovací fluorimetrie

Nanodiferenční skenovací fluorimetrie (nanoDSF) byla použita ke stanovení termostability mutantů GCPII. Tato metoda využívá fluorescenční vlastnosti postranního řetězce tryptofanu, respektive změny poměru emitovaného fluorescenčního záření o vlnové délce 330 a 350 nm, v závislosti na změně charakteru okolí při rozbalování struktur proteinu měřením emisního záření.<sup>42</sup> Teplota tání byla odečtena v inflexním bodě křivky poměru fluorescence zmíněných vlnových délek v závislosti na teplotě, tedy v bodě maximální hodnoty křivky první derivace uvedené závislosti.

Roztok proteinu byl ředěn na koncentraci 0,1 mg/ml v TBS pufru, každý mutant GCPII byl na tuto koncentraci naředěn také v přítomnosti inhibitoru pro GCPII POLW54 o koncentraci 50  $\mu$ mol/l. Takto připravenými roztoky byly naplněny kapiláry (PR-C002

Prometheus NT.48 Series nanoDSF Grade Standard Capillaries, NanoTemper Technologies GmbH), tyto kapiláry byly vloženy do fluorimetru (Prometheus NT.48, NanoTemper Technologies GmbH). Fluorescence byla kontinuálně měřena v rozsahu teplot 15-95 °C, při zvyšování teploty o 1 °C/min.

### **3.3.12 Analytická gelová permeační chromatografie**

Pro stanovení přibližné molekulové hmotnosti mutantů byla použita gelová permeační chromatografie na koloně Shodex OHpak SB-804 (Showa Denko K.K.) zapojené v systému UFLC prominence, LC-20AD liquid chromatograph (Shimadzu). Kalibrační křivka pro kolonu byla vytvořena pomocí kitu markerů molekulových hmotností (Gel Filtration Markers Kit for Protein Molecular Weights 29,000-700,000 Da, Sigma-Aldrich Corporation) a pomocí aplikace Microsoft Excel byla určena regresní rovnice této křivky jako závislost molekulové hmotnosti na elučním objemu.

Ředěním v TBS pufru byly získány roztoky rhGCPII o koncentraci 0,5 mg/ml, 10 µl těchto roztoků bylo postupně nanášeno na kolonu průtokovou rychlostí 1 ml/min. Molekulové hmotnosti Ca<sup>2+</sup> mutantů a wtGCPII byly určeny dosazením jejich elučních objemů do regresní rovnice kalibrační křivky.

### **3.3.13 Difúzní krystalizace ve visící kapce**

Krystalografie proteinů je klíčová technika pro řešení struktury proteinů za použití difrakce rentgenového záření na monokrystalech. Vznik nukleačního jádra krystalu je závislý na mnoha podmínkách jako koncentrace a čistota roztoku proteinu, koncentrace srážedla, teplota, pH a samotný postup krystalizace.<sup>43</sup>

Pro krystalizaci mutantů GCPII byly použity roztoky srážedla používané v naší laboratoři pro krystalizaci GCPII, tedy kombinace 32-34% pentaerythritol propoxylátu a 1-3% polyethylenglykolu 3350. Visící kapky byly vytvořeny smísením srážecího roztoku s roztokem rhGCPII v poměrech 1,5:1; 1:1 a 1:1,5 na silikonizovaném krycím sklíčku, které bylo umístěno nad rezervoár 0,7 ml stejného srážecího roztoku. Pro krystalizaci byl použit roztok mutantu GCPII o koncentraci 9 mg/ml obsahujícího inhibitor pro GCPII 2-PMPA o koncentraci 2,5 mmol/l. Krystalizace probíhala v krystalizační desce (SuperClear 24 Well Plate, Crystalgen, Inc.) při 20 °C.



## 4 Výsledky

Cílem této bakalářské práce je objasnit, jaký je vliv vápenatého iontu koordinačně vázaného v molekule lidské GCPII na aktivitu, strukturu a stabilitu tohoto enzymu. Na základě známé koordinační sféry  $\text{Ca}^{2+}$  byly navrženy a provedeny bodové mutace v sekvenci genu extracelulární části lidské GCPII (aminokyseliny 44-750) na pozicích kódujících aminokyseliny koordinující  $\text{Ca}^{2+}$  ion postranními řetězci (Tab 1). Takto upravené sekvence DNA byly v Laboratoři strukturní biologie Biotechnologického ústavu AV ČR zaklonovány do plazmidu pMT/BiP/V5-His A (Invitrogen) vhodného pro expresi v Schneiderových S2 buňkách.<sup>36</sup> Na N-konci produkovaných rekombinantních proteinů byla připojena sekvence StrepII-FLAG-TEV-StrepII-TEV sloužící k purifikaci pomocí afinitní chromatografie a následnému odštěpení této sekvence.

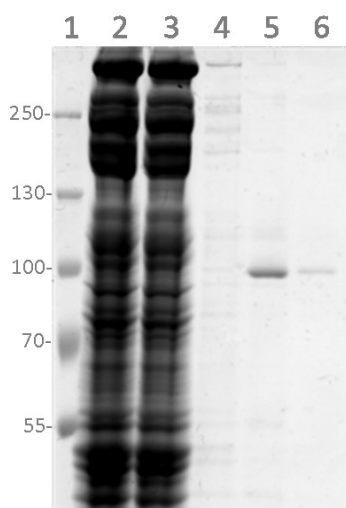
V rámci této práce byly tyto plazmidy spolu se selekčním plazmidem pCoBlast transfekovány do S2 buněk, po selekci blasticidinem byla indukována exprese mutantů GCPII pomocí roztoku síranu měďnatého. Mutanty byly díky N-koncové BiP sekvenci v plazmidu sekretovány do média, které bylo zakoncentrováno a dialýzou připraveno pro streptaktinovou afinitní chromatografii.

Tabulka 1 – Seznam provedených mutací v sekvenci genu lidské GCPII

Původní aminokyselina	Číslo aminokyseliny v polypeptidovém řetězci GCPII	Náhradní aminokyselina	Označení mutantu rhGCPII
Thr	269	Ala	T269A
		Ser	T269S
		Val	T269V
Glu	433	Ala	E433A
	436	Ala	E436A

## 4.1 Streptaktinová afinitní chromatografie

Pro oddělení mutantu GCPII ze směsi proteinů v médiu byla použita streptaktinová afinitní chromatografie. Rekombinantní protein s N-koncovou StrepII purifikační značkou byl navázán na kolonu, po promytí kolony eluován desthiobiotinem a jímán ve dvou 5ml frakcích. Výsledek afinitní chromatografie byl analyzován pomocí SDS-PAGE (Obr. 9), mutant E433A je zde uveden jako reprezentativní příklad purifikace ostatních variant, neboť výsledky všech afinitních purifikací byly obdobné. Z obr. 10 je zřejmé, že tento krok purifikace mutantu byl úspěšný. V drahách s nanesenými elučními frakcemi jsou výrazné pásy ve velikosti odpovídající molekulové hmotnosti okolo 100 kDa, tedy velikosti monomeru GCPII. Lze také konstatovat, že eluované frakce obsahují jen velmi málo kontaminujících proteinů, nicméně k získání čistého mutantu GCPII je třeba ještě další purifikační krok.



**Obrázek 9 – SDS-PAGE analýza výsledku afinitní chromatografie mutantu E433A**

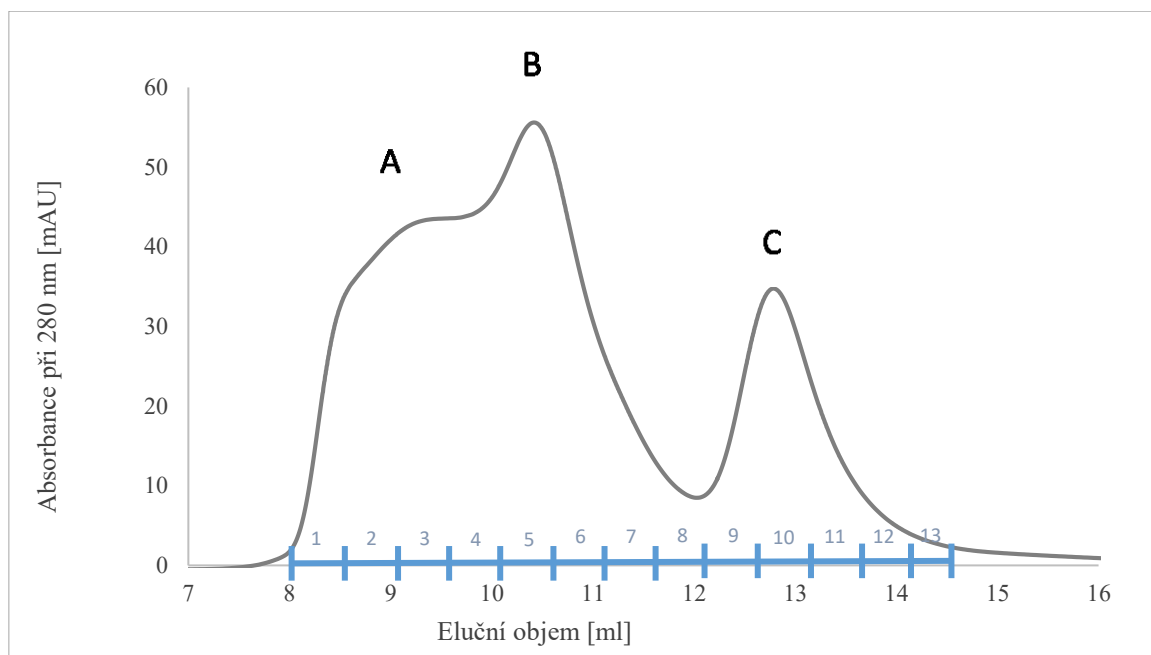
Vzorky nanesené do jednotlivých jamek 10% gelu: 1 – Marker PageRuler (kDa), 2 – Koncentrát média nastříkovaný na kolonu, 3 – Koncentrát proteklý kolonou, 4 – Pufr po promytí kolony, 5 – První eluční frakce, 6 – Druhá eluční frakce

Výtěžek wtGCPII bývá kolem 10 mg proteinu, výtěžky tohoto purifikačního kroku  $\text{Ca}^{2+}$  mutantů byly výrazně nižší (0,2-1,3 mg). Výtěžnost se velmi liší, jak mezi jednotlivými nárusty (mutanty byly produkovány několikrát), tak mezi různými mutanty.

#### 4.1.1 Preparativní gelová permeační chromatografie

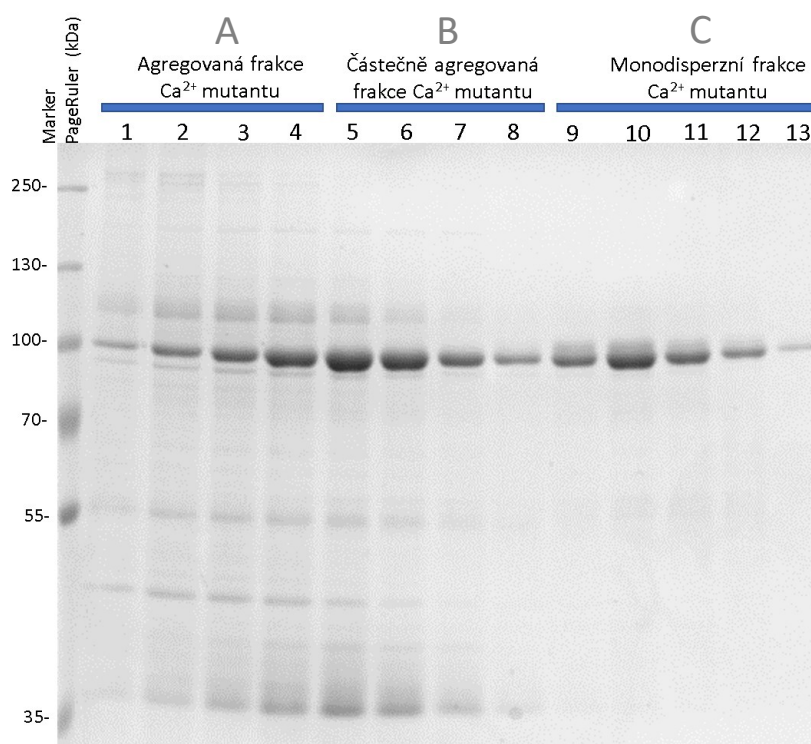
Eluční frakce koncentrované na objem 0,5 ml byly nastříkovány na kolonu gelové permeační chromatografie (GPC). Data o průběh separace byla zaznamenávána v chromatogramu závislosti absorpance při 280 nm na elučním objemu, který byl porovnáván s gelem z SDS-PAGE. Na obr. 10 je příklad chromatogramu purifikace mutantu E433A. Eluční profily purifikací ostatních mutantů pomocí GPC byly obdobné. S mrtvým objemem se jako u každé preparativní gelové chromatografie začínají eluovat agregáty s  $M_w$  nad 600 kDa (A; Obr. 10). Vrchol odpovídající těmto agregátům je spojen s vrcholem, který má podle kalibrace kolony molekulovou hmotnost asi 320 kDa, tedy větší než rhGCPII (B; Obr. 10). Při gelové permeační chromatografii wtGCPII prováděné v naší laboratoři se tento vrchol s částečnými agregáty nevyskytuje a celkový poměr agregátů vůči monodisperznímu proteinu je výrazně posunut ve prospěch monodisperzního proteinu (Obr. 12). Na SDS-PAGE gelu mají oba tyto spojené vrcholy nejvýraznější pásy proteinů o velikosti 100 kDa, obsahují tedy mutant GCPII, ale vyskytují se v nich i kontaminující proteiny o jiné molekulové hmotnosti (Obr. 11).

Následující vrchol (C, Obr 10) již podle molekulové hmotnosti přibližně 200 kDa odpovídá správně sbalenému monodisperznímu mutantu GCPII. Odpovídající frakce neobsahují po nanesení na gel SDS-PAGE kontaminující proteiny, které se vyskytovaly v prvních dvou vrcholech chromatogramu. Proti purifikaci wtGCPII, jsou výtěžky  $Ca^{2+}$  mutantů výrazně nižší, o jejich část přicházíme z důvodu jejich zmíněné agregace, zřejmě je ale proti wtGCPII nízká i jejich exprese v S2 buňkách.



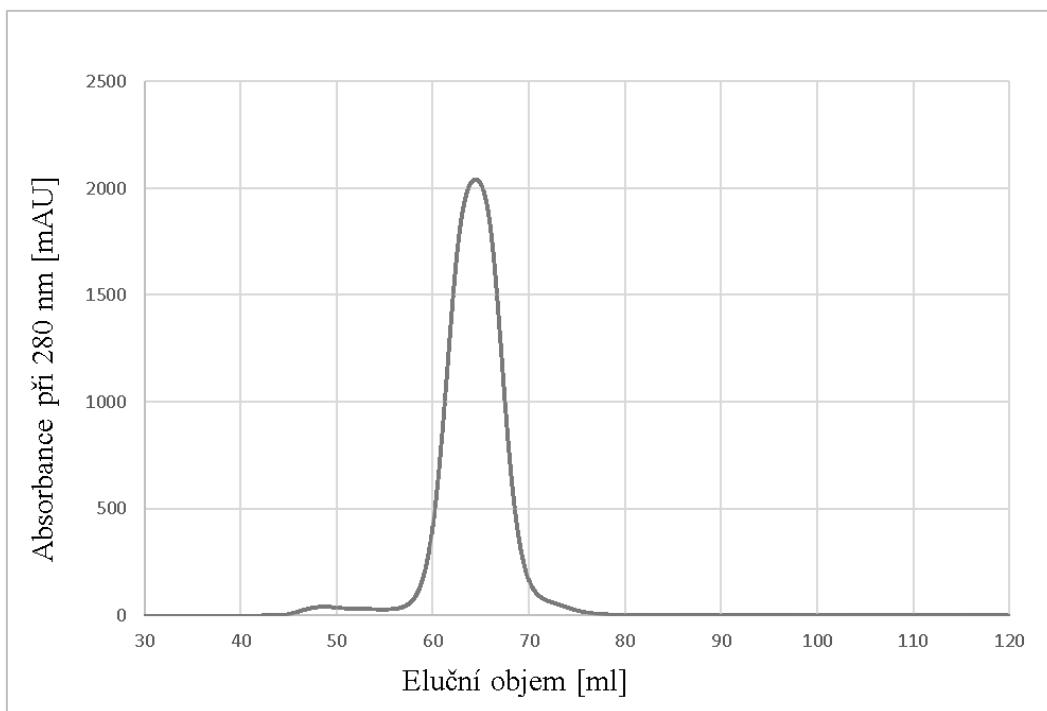
**Obrázek 10 – Chromatogram GPC purifikace E433A**

Kolona Superdex 200 Increase 10/300, v TBS pufru, A-vrchol agregátů, B-vrchol částečných agregátů, C-monodisperzní frakce. Modře jsou popsána čísla smíraných frakcí odpovídající frakcím na gelu SDS-PAGE.



**Obrázek 11 – Gel SDS-PAGE výsledku GPC mutantu E433A**

Frakce GPCnanesené na 10% gel odpovídající vrcholům (A, B, C) chromatogramu (Obr. 10).

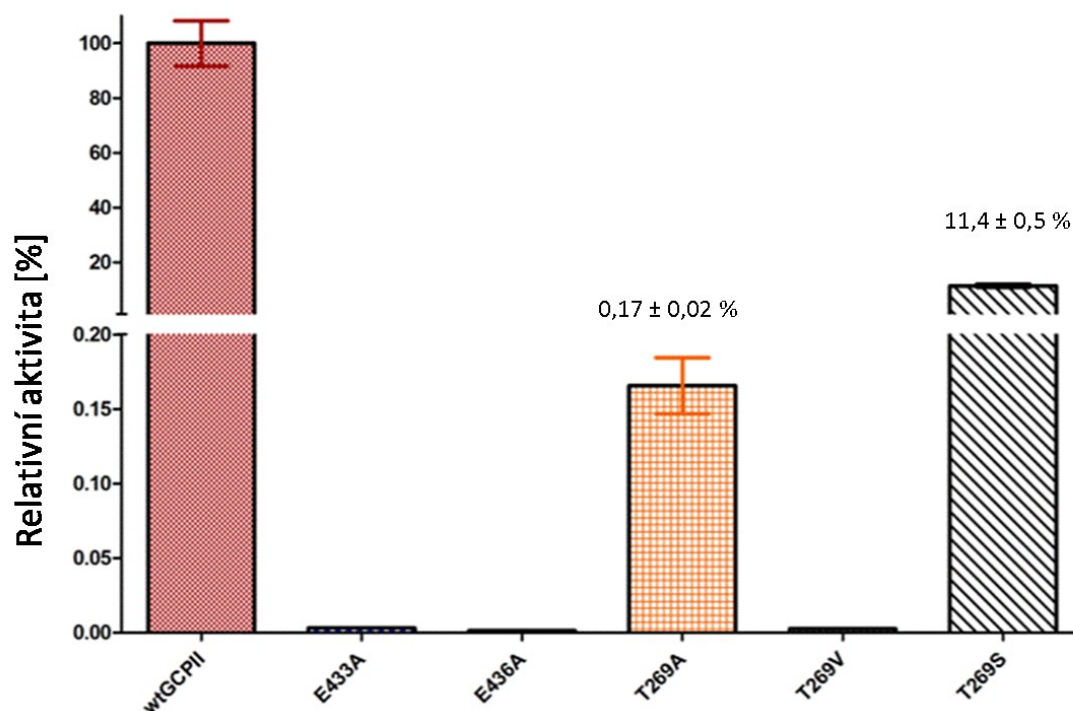


Obrázek 12 – Chromatogram GPC purifikace wtGCPII, kolona Superdex 16 60/200

## 4.2 Radiometrické měření aktivity

Enzymatická aktivita  $\text{Ca}^{2+}$  mutantů GCPII byla měřena pomocí radioaktivně značeného substrátu N-acetylaspartylglutamátu, který je přirozeným substrátem GCPII, štěpeným na N-acetylaspartát a glutamát obsahující navázané tritium. Aby mohla být stanovena reakční rychlost i u mutantů s řádově nižší aktivitou ve srovnání s wtGCPII, byly použity vyšší koncentrace enzymu a naměřené aktivity poté vztaženy na aktivitu a odpovídající koncentraci wtGCPII.

Na Obr. 13 je zobrazena relativní enzymatická aktivita  $\text{Ca}^{2+}$  mutantů GCPII v porovnání s aktivitou wtGCPII. Je zřejmé, že mutanty E433A, E436A a T269V jsou zcela neaktivní. Pro mutant s alaninem místo threoninu byla naměřena velmi slabá enzymatická aktivita ( $0,17 \pm 0,02$  %) wtGCPII. Mutant T269S dosahuje ( $11,4 \pm 0,5$  %) enzymatické aktivity wtGCPII.



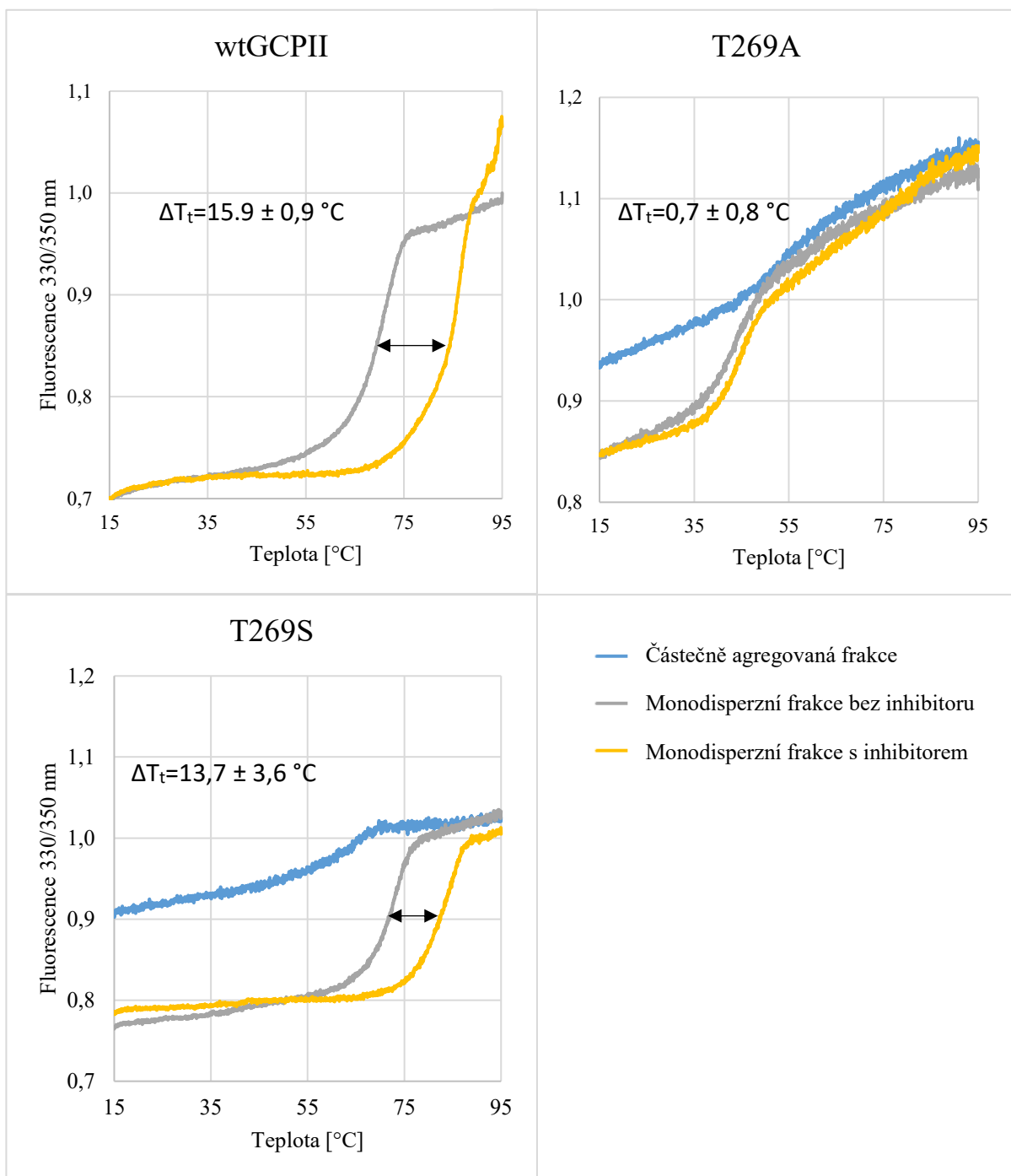
Obrázek 13 – Relativní aktivita  $\text{Ca}^{2+}$  mutantů GCPII v porovnání s aktivitou wtGCPII (100 %)

Aktivita byla stanovena kvantifikací štěpeného radioaktivně značeného glutamátu ze substrátu NAAG. Mutanty E433A, E436A a T269V jsou neaktivní, aktivita T269A je  $0,17 \pm 0,02$  % aktivity wtGCPII, mutant T269S vykazuje  $11,4 \pm 0,5$  % aktivity wtGCPII.

### 4.3 Nanodiferenční skenovací fluorimetrie

Pomocí nanodiferenční skenovací fluorimetrie byla zjišťována termostabilita  $\text{Ca}^{2+}$  mutantů GCPII. Teplotní denaturace byla měřena v rozsahu teplot 15-95 °C.

Termostabilita  $\text{Ca}^{2+}$  mutantů byla měřena pro samotné proteiny a dále také v přítomnosti inhibitoru pro GCPII POLW 54. Přítomnost inhibitoru v roztoku a tvorba jeho komplexu s wtGCPII enzym stabilizuje a zvyšuje jeho teplotu tání ( $T_t$ ) o přibližně 15 °C (Tab. 2). Pro částečně agregované frakce žádného mutantu nebyla naměřena konkrétní teplota tání, sbalení molekul je nehomogenní, pravděpodobně částečně nestrukturované. Pro monodisperzní frakce mutantů T269A, T269V a E433A se naměřené teploty tání pohybují mezi 43-48 °C, jsou tedy výrazně nižší než  $T_t$  wtGCPII.  $T_t$  monodisperzní frakce mutantu T269S odpovídá  $T_t$  wtGCPII v přítomnosti inhibitoru i bez něho.



**Obrázek 14 – Grafy závislosti poměru fluorescence proteinu při 330/350 nm na teplotě**

Teplota byla zvyšována rychlostí 1  $^\circ\text{C}/\text{min}$ , protein byl na koncentraci 0,1 mg/ml ředěn pomocí TBS pufru. Šípkami jsou označeny rozdíly mezi  $T_t$  proteinů v závislosti na přítomnosti inhibitoru.

**Tabulka 2 – Teploty tání wtGCPII, částečně agregovaných a monodisperzních frakcí Ca<sup>2+</sup> mutantů**

0 – pro danou možnost byla sbírána data, ale nebyla nalezena žádná výrazná změna fluorescence, tedy teplota tání nemohla být určena.

	Teplota tání [°C]	
	bez inhibitoru	s inhibitorem
wtGCPII	70,4 ± 0,8	86,3 ± 0,0
T269A	44,0 ± 0,6	44,6 ± 0,2
T269S	70,0 ± 4,3	83,7 ± 0,7
T269V	46,7 ± 0,2	46,8 ± 0,7
E433A	47,4 ± 0,1	47,1 ± 0,1
E436A	0	0

#### 4.3.1 Analytická gelová permeační chromatografie

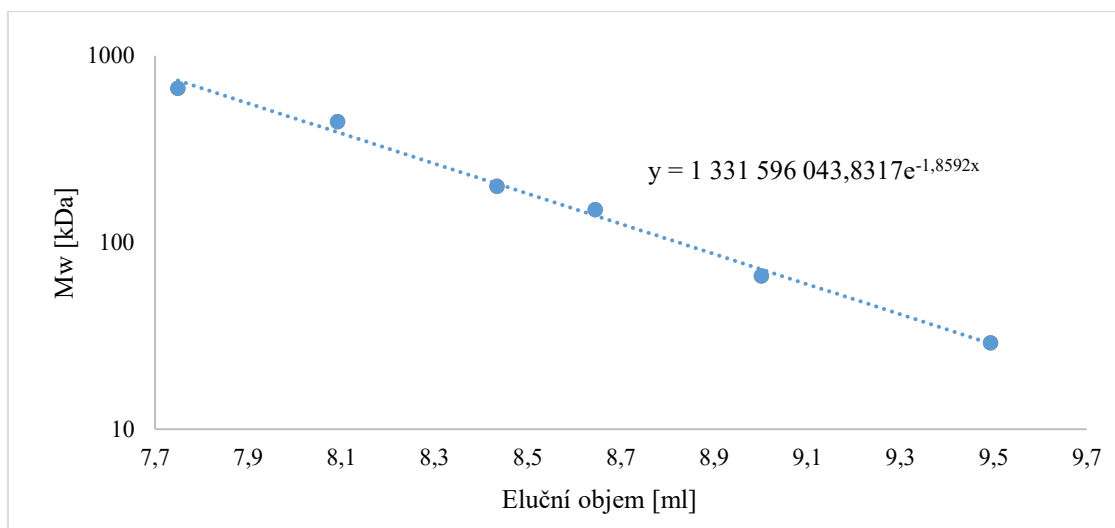
Pomocí kolony pro GPC (Shodex OHpak SB-804 HQ, Showa Denko K.K.) zapojené do HPLC systému byla stanovována molekulová hmotnost mutantů podle kalibrace provedené sadou proteinů o různé molekulové hmotnosti (Gel Filtration Markers Kit for Protein Molecular Weights 29,000-700,000 Da, Sigma-Aldrich Corporation).

Chromatografické vrcholy pro wtGCPII, mutant T269S a T269A jsou v Obr. 16, Eluční vrcholy neuvedených mutantů byly obdobné jako vrchol T269A. Stanovená molekulová hmotnost pro wtGCPII 164 kDa, mutanty mají buď stejnou Mw nebo přibližně poloviční. Mutant T269S se vyskytuje v obou formách (Tab. 3).

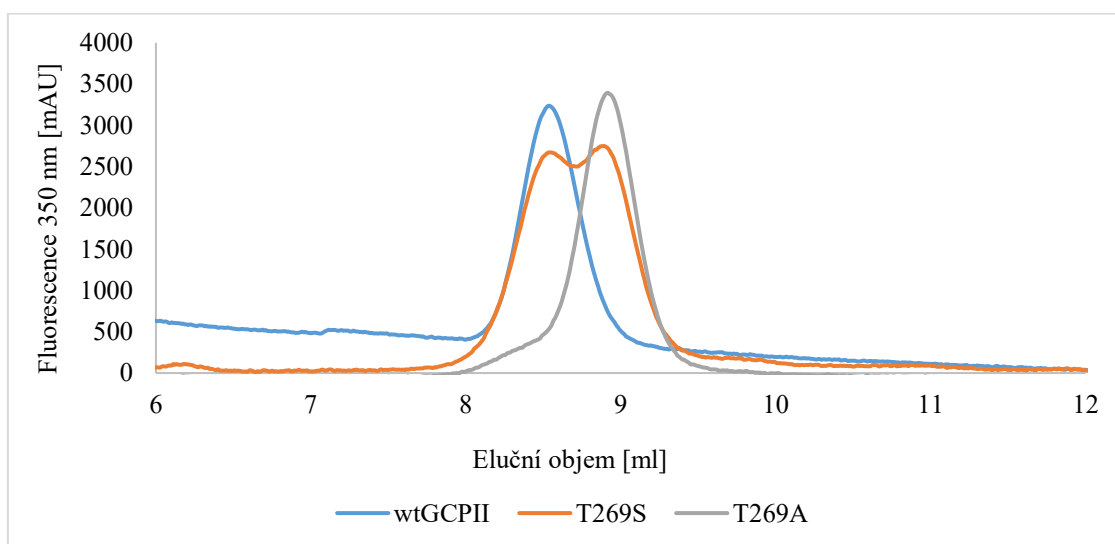
**Tabulka 3 – Stanovené molekulové hmotnosti Ca<sup>2+</sup> mutantů a wtGCPII**

	Molekulová hmotnost [kDa]	
wtGCPII	164	
T269A	84	
T269S	167	89
T269V	85	
E433A	99	





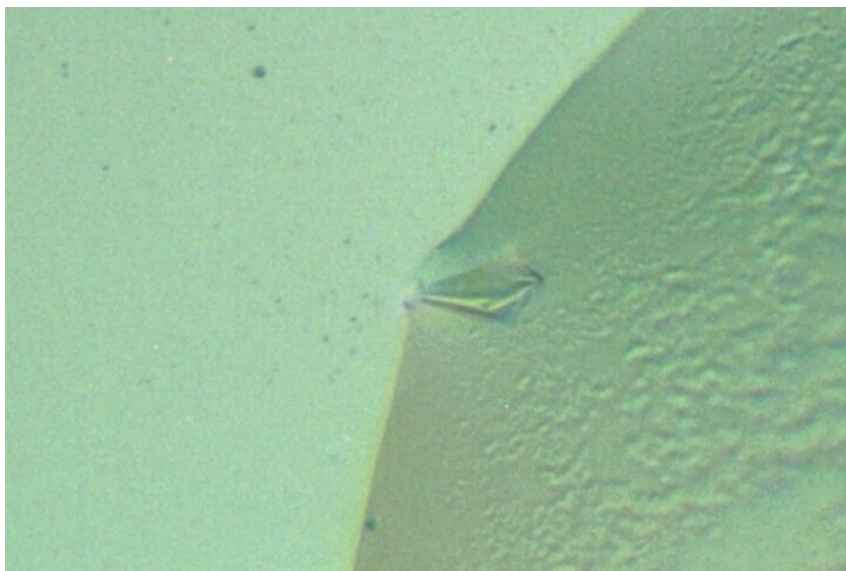
Obrázek 15 – Kalibrační křivka kolony Shodex OHpak SB-804 HQ závislosti molekulové hmotnosti na elučním objemu



Obrázek 16 – Porovnání chromatogramů GPC pro mutanty T269S, T269A a wtGCPII

### 4.3.2 Krystalizace

Pro krystalizace mutantů E433A, E436A a T269V nebyl čistých dostatek proteinu, proto byly krystalizovány pouze mutanty T269A a T269S. V podmínkách 32% pentaerythritol propoxylát s polyethylenglykolem o obsahu 1 a 2 % v přítomnosti inhibitoru 2-PMPA vyrostly krystaly mutantu T269S (Obr.17).



**Obrázek 17 – Krystal mutantu T269S v podmínkách: 32% pentaerythritol propoxylát, 1%polyethylenglykol**

## 5 Diskuse

Vápenatý ion vázaný v molekule proteinu má ve většině popsáných případech strukturní a stabilizační funkci.<sup>29</sup> Cílem této práce je pomocí bodově cílených mutací objasnit, jaký význam má vápenatý ion v molekule lidské GCPII. Z toho důvodu byly navrženy mutace v sekvenci GCPII pro aminokyseliny koordinující  $\text{Ca}^{2+}$  ion svými postranními řetězci. Jedná se o glutamáty na pozicích 433 a 436, které byly vyměněny za alanin. Dále pak byly provedeny záměny threoninu 269 za alanin, valin a serin. Valin byl zvolen, protože se od threoninu liší pouze methylem navázaném na  $\beta$ -uhlíku místo hydroxylu, donoru elektronového páru koordinační vazby s vápníkem. Další navrženou variantou je serin, který obsahuje hydroxyl na stejné pozici jako threonin, takže by měl být schopen tvořit s  $\text{Ca}^{2+}$  iontem stejnou koordinační vazbu.

Koordinační sféra  $\text{Ca}^{2+}$  iontu v lidské GCPII je vysoce konzervovaná. V paralogních proteinech GCPIII a NAALADase L a sekvenčně příbuzném transferinovém receptoru se koordinační sféra  $\text{Ca}^{2+}$  iontu liší nanejvýš v aminokyselině, která se vazby účastní karbonylovou skupinou hlavního řetězce (Tab. 4). V nezměněné podobě se  $\text{Ca}^{2+}$  vazebné místo vyskytuje v myším, potkaním a prasečím orthologu GCPII.<sup>44</sup> Z takto vysoké konzervovanosti lze usoudit, že iont  $\text{Ca}^{2+}$  je pro strukturu a funkci GCPII a jejích homologů velmi důležitý. Jak se ukázalo na výsledcích provedených experimentů, každá výše popsaná mutace způsobila nestabilitu proteinu, ačkoli změna byla minimální.

**Tabulka 4 – Primární sekvence Ca<sup>2+</sup> vazebného místa lidské GCPII, jejích orthologů a paralogů**

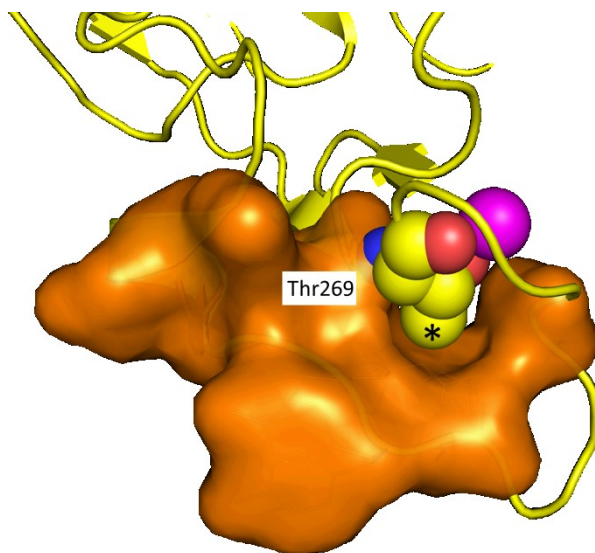
Červeně jsou vyznačeny aminokyseliny tvořící koordinační vazbu kyslíkem postranního řetězce. Aminokyseliny, které koordinují Ca<sup>2+</sup> karbonylem hlavního řetězce, jsou vyznačeny modře. Sekvence proteinů jsou v rozsahu aminokyselin 254-287 a 418-451 lidské GCPII.

	Primární struktura	
Lidská GCPII	Q R G N I L N L N G A G D P L T P G Y P A N E Y A Y R R G I A E A V	F A S W D A E E F G L L G S T E W A E E N S R L L Q E R G V A Y I N
Orthology		
Prase domácí	Q R G N I L N L N G A G D P L T P G Y P A N E Y A Y R L Q I A E A V	F A S W D A E E Y G L F G S T E W A E E N S R I L Q E R G V A Y I N
Potkan obecný	Q R G N V L N L N G A G D P L T P G Y P A N E Y A Y R H E F T E A V	F A S W D A E E F G L L G S T E W A E E H S R L L Q E R G V A Y I N
Myš domácí	Q R G N V L N L N G A G D P L T P G Y P A N E H A Y R H E L T N A V	F A S W D A E E F G L L G S T E W A E E H S R L L Q E R G V A Y I N
Paralogy		
GCPIII	Q R G N V L N L N G A G D P L T P G Y P A K E Y T F R L D V E E G V	F A S W D A E E F G L L G S T E W A E E N V K I L Q E R S I A Y I N
NAALADasa L	G V E R G S Y Y E Y F G D P L T P G Y L P A V P S S F R V D L A N V S	F A S W G A E E F G L I G S T E F T E E F F N K L Q E R T V A Y I N
Transferinový receptor	L S F F G H A H L G T G D P Y T P G F P S F N H T Q F P P S R S S G	F A S W S A G D F G S V G A T E W L E G Y L S S L H L K A F T Y I N

Expresí Ca<sup>2+</sup> mutantů byla provedena stejným způsobem, jak bylo již dříve popsáno pro wtGCPII.<sup>36</sup> Výtěžky jednotlivých expresí se výrazně lišily mezi jednotlivými nárůsty i mezi různými mutanty, vždy ale byly několikanásobně nižší než při expresích wtGCPII. Glutamátové mutanty a mutant obsahující na místě 269 valin místo threoninu byly exprimovány ještě méně než mutanty s alaninem nebo serinem místo threoninu. Jedním z důvodů je pravděpodobně špatné sbalování mutantních proteinů v S2 buňkách spojené s následnou degradací velké části exprimovaných proteinů. Při GPC se v chromatogramu (Str. 30; Obr. 11) vyskytují výrazné vrcholy obsahující molekuly o větší Mw než rhGCPII. Jednak jde o vrchol agregátů větších než 600 kDa, jednak vrchol částečných agregátů, jehož elučnímu objemu odpovídají molekuly s Mw kolem 300 kDa. Při purifikaci wtGCPII se agregáty v chromatogramu vyskytují v poměru k množství monodisperzního proteinu jen v malé míře a částečné agregáty se zde nevyskytují vůbec. Frakce odpovídající těmto vrcholům na SDS-PAGE gelu (Str. 30; Obr. 12) obsahují hlavně rhGCPII, v malé míře také kontaminující proteiny s větší i menší molekulovou

hmotností. Dochází zde pravděpodobně k částečné agregaci s těmito kontaminujícími proteiny. Je tedy zřejmé, že provedené mutace narušují stabilitu molekul rhGCPII v roztoku. Vrchol odpovídající elučním časem wtGCPII je dobře definovaný, při analýze pomocí SDS-PAGE neobsahuje kontaminující proteiny, považujeme ho tedy za monodisperzní mutanty GCPII. Výtěžnost vypurifikovaného proteinu je ale velmi nízká, neboť na rozdíl od wtGCPII zde přicházíme o velkou část proteinu jeho výraznou agregací.

První stanovovanou charakteristikou  $\text{Ca}^{2+}$  mutantů byla enzymatická aktivita měřená dříve popsaným způsobem pro wtGCPII pomocí substrátu N-acetylaspartylglutamátu značeného tritiem.<sup>36</sup> Jediným aktivním mutantem byl T269S, jeho aktivita dosahovala  $11,4 \pm 0,5$  procent aktivity wtGCPII. Ačkoli tomuto mutantu neschází žádný donor elektronů koordinující vápenatý ion, je aktivita mutantu T269S proti wtGCPII výrazně snižena. Methylová skupina na  $\alpha$ -uhlíku threoninu zřejmě je v kontaktu s okolními aminokyselinami (Obr. 18), které jsou součástí dimerizačního rozhraní a jeho nepřítomnost způsobuje konformační změnu tohoto okolí, která má, podle experimentálních výsledků, vliv na konformaci a vlastnosti celé molekuly. Ostatní mutanty nejsou aktivní nebo je jejich aktivita velmi nízká. Aminokyseliny alanin a valin, kterými byl nahrazen glutamát a threonin v těchto mutantech, neobsahují v postranním řetězci žádný atom, který by mohl být donorem elektronů v koordinační vazbě vápenatého iontu. Strukturní změny způsobené těmito mutacemi jsou zřejmě natolik rozsáhlé, že ovlivňují i aktivní místo enzymu, ačkoliv je v molekule proteinu od  $\text{Ca}^{2+}$  iontu vzdálené 20 Å.



**Obrázek 18 – Kapsa tvořená aminokyselinami v okolí methyly postranního řetězce Thr269**

Methyl Thr269 je označen hvězdičkou, aminokyselinové okolí oranžově, červená čára naznačuje navazující prostor druhého monomeru,  $\text{Ca}^{2+}$  ion fialově.

Kvůli zřejmému narušení struktury enzymu byla pro další charakterizaci mutantů měřena jejich termostabilita pomocí metody diferenční skenovací fluorimetrie. Teploty tání neaktivních mutantů jsou výrazně nižší (o asi 25 °C) než  $T_t$  wtGCPII (Str. 34; Tab 2), což potvrzuje, že stabilita, a tedy i struktura molekul těchto mutantů, je výrazně narušená. Aktivní mutant T269S má  $T_t$  srovnatelnou s wtGCPII, jeho struktura tedy zřejmě není výrazně narušená, jak lze předpokládat z podobnosti koordinačních vlastností serinu s threoninem. Termostabilita byla stejným způsobem měřena i pro částečně agregovanou frakci. Její  $T_t$  ale nebyla stanovitelná, protože k žádnému výraznému posunu poměru fluorescence nedocházelo, pouze se pomalu zvyšoval po celou dobu změny teploty (Str. 33; Obr. 14). Tento fakt ukazuje na nestrukturovanost molekul této frakce.

DSF byla provedena také v přítomnosti inhibitoru pro wtGCPII, který výrazně zvyšuje termostabilitu enzymu, jeho přítomností se  $T_t$  wtGCPII zvyšuje o 15 °C. Na termostabilitu aktivního mutantu T269S má přítomnost inhibitoru stejný vliv jako na wtGCPII, což potvrzuje, že jeho struktura není výrazně narušená.  $T_t$  ostatních mutantů se přítomností inhibitoru nemění, terciální struktura je pravděpodobně narušená natolik, že se inhibitor do aktivního místa enzymu neváže stejně, jako se zřejmě nevázal ani substrát při měření aktivity.

Vzhledem k tomu, že struktura většiny mutantů je zřejmě výrazně narušená a koordinační místo  $\text{Ca}^{2+}$  iontu se vyskytuje v bezprostřední blízkosti dimerizačního

rozhraní GCPII, byla metodou analytické gelové permeační chromatografie stanovena molekulová hmotnost mutantů. Zatímco wtGCPII tvoří v roztoku vždy dimer, neaktivní mutanty T269A, T269V a E433A se v roztoku vyskytují jako monomery. Aktivní T269S se v roztoku vyskytuje jak ve formě monomeru, tak i ve formě dimeru. Přechod mezi monomerní a dimerní formu GCPII v závislosti na složení roztoku již byl popsán pomocí analytické GPC.<sup>46</sup> Ze získaných výsledků ale není jasné, jestli tyto dvě formy mutantu jsou schopny mezi sebou přecházet nebo je poměr jejich zastoupení v roztoku již předem dán vnějšími podmínkami při expresi či purifikaci. Jak vyplývá ze získaných dat, poměr těchto dvou forem se pravděpodobně mění. V případě termostability je chování mutantu T269S shodné s wtGCPII, zatímco při purifikaci, analytické GPC a stanovení enzymatické aktivity se do jisté míry liší.

Mutace, které vylučují koordinační vazbu některého z původních donorů, tedy způsobují, že rhGCPII je monomerní. Dimerizace je zřejmě nezbytnou podmínkou pro enzymatickou aktivitu GCPII. Tento závěr potvrzují i data pro mutant T269S. Tento mutant má proti wtGCPII sníženou enzymatickou aktivitu, za kterou je pravděpodobně zodpovědná dimerní část proteinu, což rovněž souhlasí s publikovanými daty (Schulke et al.), kde je nízká aktivita monomeru GCPII připisována zbytkovému zastoupení dimeru.<sup>45</sup> Podobně snížená je například i aktivita monomeru přirozeně dimerní glykogenfosforylasy.<sup>46</sup>

Narušení ideální geometrie koordinačních vazeb kolem  $\text{Ca}^{2+}$  v uspořádání pentagonální bipyramidy má zřejmě negativní vliv na schopnost dimerizace rhGCPII, ať už je  $\text{Ca}^{2+}$  v molekulách monomerních mutantů přítomen či nikoli. Také není jasné, zda je  $\text{Ca}^{2+}$  přítomen pouze v dimeru nebo i v monomeru mutantu T269S. Výsledek probíhajících krystalizací by mohl tuto otázku zodpovědět.

## 6 Závěr

Pro objasnění vlivu  $\text{Ca}^{2+}$  iontu na aktivitu lidské glutamátcarboxypeptidasy II byly provedeny exprese rhGCPII s mutacemi v aminokyselinách threoninu a glutamátu, které svými postranními řetězci koordinují vápenatý ion uvnitř molekuly proteinu.

Mutanty, ve kterých chybí některý z donorů koordinačních vazeb, se v roztoku vyskytují buď ve formě agregátů, nebo monomerů, nejsou enzymaticky aktivní a jsou méně stabilní než wtGCPII. Na základě získaných dat lze konstatovat, že správná koordinace vápenatého iontu v molekule GCPII všemi vazebnými partnery je nezbytná k dimerizaci proteinu a dimerizace je podmínkou pro enzymatickou aktivitu.



## 7 Soupis bibliografických citací

- (1) Bařinka, C.; Rojas, C.; Slusher, B.; Pomper, M. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19* (6), 856–870.
- (2) Neale, J. H.; Bzdega, T.; Wroblewska, B. *J. Neurochem.* **2000**, *75* (2), 443–452.
- (3) Thomas, A. G.; Olkowski, J. L.; Slusher, B. S. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *426* (1–2), 35–38.
- (4) Sáčha, P.; Zámečník, J.; Barinka, C.; Hlouchová, K.; Vích, A.; Mlcochová, P.; Hilgert, I.; Eckschlager, T.; Konvalinka, J. *Neuroscience* **2007**, *144* (4), 1361–1372.
- (5) Chang, S. S.; Reuter, V. E.; Heston, W. D.; Bander, N. H.; Grauer, L. S.; Gaudin, P. B. *Cancer Res.* **1999**, *59* (13), 3192–3198.
- (6) Heston, W. D. *Urology* **1997**, *49* (3A Suppl), 104–112.
- (7) Su, S. L.; Huang, I. P.; Fair, W. R.; Powell, C. T.; Heston, W. D. *Cancer Res.* **1995**, *55* (7), 1441–1443.
- (8) Bostwick, D. G.; Pacelli, A.; Blute, M.; Roche, P.; Murphy, G. P. *Cancer* **1998**, *82* (11), 2256–2261.
- (9) Lu-Yao, G. L. *JAMA* **2009**, *302* (11), 1202.
- (10) Foss, C. A.; Mease, R. C.; Cho, S. Y.; Kim, H. J.; Pomper, M. G. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19* (9), 1346–1359.
- (11) A. Rahn, K.; S. Slusher, B.; I. Kaplin, A. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19* (9), 1335–1345.
- (12) Stefani, A.; Spadoni, F.; Bernardi, G. *Exp. Neurol.* **1997**, *147* (1), 115–122.
- (13) Jackson, P. F.; Cole, D. C.; Slusher, B. S.; Stetz, S. L.; Ross, L. E.; Donzanti, B. A.; Trainor, D. A. *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (2), 619–622.
- (14) Slusher, B. S.; Vornov, J. J.; Thomas, A. G.; Hurn, P. D.; Harukuni, I.; Bhardwaj, A.; Traystman, R. J.; Robinson, M. B.; Britton, P.; Lu, X. C.; Tortella, F. C.; Wozniak, K. M.; Yudkoff, M.; Potter, B. M.; Jackson, P. F. *Nat. Med.* **1999**, *5* (12), 1396–1402.
- (15) Hecker, S. J.; Erion, M. D. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (8), 2328–2345.
- (16) Murphy, G. P.; Maguire, R. T.; Rogers, B.; Partin, A. W.; Nelp, W. B.; Troychak, M. J.; Ragde, H.; Kenny, G. M.; Barren, R. J.; Bowes, V. A.; Gregorakis, A. K.; Holmes, E. H.; Boynton, A. L. *The Prostate* **1997**, *33* (4), 281–285.
- (17) Smith-Jones, P. M.; Vallabhajosula, S.; Navarro, V.; Bastidas, D.; Goldsmith, S. J.; Bander, N. H. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **2003**, *44* (4), 610–617.
- (18) Henry, M. D.; Wen, S.; Silva, M. D.; Chandra, S.; Milton, M.; Worland, P. J. *Cancer Res.* **2004**, *64* (21), 7995–8001.
- (19) Zhou, J.; Neale, J. H.; Pomper, M. G.; Kozikowski, A. P. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4* (12), 1015–1026.
- (20) Rowe, S. P.; Macura, K. J.; Ciarallo, A.; Mena, E.; Blackford, A.; Nadal, R.; Antonarakis, E. S.; Eisenberger, M. A.; Carducci, M. A.; Ross, A. E.; Kantoff, P. W.; Holt, D. P.; Dannals, R. F.; Mease, R. C.; Pomper, M. G.; Cho, S. Y. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57* (1), 46–53.
- (21) Wondergem, M.; van der Zant, F.; Knol, R.; Lazarenko, S.; Pruim, J.; de Jong, I. J. *J. Nucl. Med.* **2017**, jnumed.117.192658.
- (22) Berg, J. M. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1987**, *52* (0), 579–585.

- (23) Andreini, C.; Cavallaro, G.; Lorenzini, S.; Rosato, A. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41* (D1), D312–D319.
- (24) Harding, M. M. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2004**, *60* (5), 849–859.
- (25) Andreini, C.; Bertini, I.; Rosato, A. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42* (10), 1471–1479.
- (26) Holm, R. H.; Kennepohl, P.; Solomon, E. I. *Chem. Rev.* **1996**, *96* (7), 2239–2314.
- (27) Zheng, H.; Chruszcz, M.; Lasota, P.; Lebioda, L.; Minor, W. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102* (9), 1765–1776.
- (28) Li, H.; Li, C. *J. Comput. Chem.* **2010**, NA-NA.
- (29) Pidcock, E.; Moore, G. R. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2001**, *6* (5–6), 479–489.
- (30) Yáñez, M.; Gil-Longo, J.; Campos-Toimil, M. In *Calcium Signaling*; Islam, M. S., Ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2012; Vol. 740, pp 461–482.
- (31) Yang, W.; Lee, H.-W.; Hellinga, H.; Yang, J. J. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2002**, *47* (3), 344–356.
- (32) Bindreither, D.; Lackner, P. *Gen. Physiol. Biophys.* **2009**, *28 Spec No Focus*, F82–88.
- (33) Rajasekaran, S. A. *Mol. Biol. Cell* **2003**, *14* (12), 4835–4845.
- (34) Mesters, J. R.; Barinka, C.; Li, W.; Tsukamoto, T.; Majer, P.; Slusher, B. S.; Konvalinka, J.; Hilgenfeld, R. *EMBO J.* **2006**, *25* (6), 1375–1384.
- (35) Rawlings, N. D.; Barrett, A. J. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1339* (2), 247–252.
- (36) Barinka, C.; Rinnová, M.; Šácha, P.; Rojas, C.; Majer, P.; Slusher, B. S.; Konvalinka, J. *J. Neurochem.* **2002**, *80* (3), 477–487.
- (37) Schmidt, T. G. M.; Skerra, A. *J. Chromatogr. A* **1994**, *676* (2), 337–345.
- (38) Schmidt, T. G.; Skerra, A. *Nat Protoc.* **2007**, *2* (6), 1528–1535.
- (39) Barinka, C.; Ptacek, J.; Richter, A.; Novakova, Z.; Morath, V.; Skerra, A. *Protein Eng. Des. Sel.* **2016**, *29* (3), 105–115.
- (40) Rath, A.; Glibowicka, M.; Nadeau, V. G.; Chen, G.; Deber, C. M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106* (6), 1760–1765.
- (41) Mori, S.; Barth, H. G. *Size Exclusion Chromatography*; Springer Science & Business Media, **2013**.
- (42) de Lange, O.; Wolf, C.; Thiel, P.; Krüger, J.; Kleusch, C.; Kohlbacher, O.; Lahaye, T. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43* (20), 10065–10080.
- (43) Dohnálek, J.; Koval', T. <http://www.fzu.cz/oddeleni/oddeleni-strukturni-analyzy/research-subjects/krystalografie-proteinu>; 22.2.2017
- (44) Hlouchová, K.; Navrátil, V.; Tykvart, J.; Šácha, P.; Konvalinka, J. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19* (9), 1316–1322.
- (45) Schulke, N.; Varlamova, O. A.; Donovan, G. P.; Ma, D.; Gardner, J. P.; Morrissey, D. M.; Arrigale, R. R.; Zhan, C.; Chodera, A. J.; Surowitz, K. G.; Maddon, P. J.; Heston, W. D. W.; Olson, W. C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100* (22), 12590–12595.
- (46) Feldmann, K.; Zeisel, H.; Helmreich, E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1972**, *69* (8), 2278–2282.